

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título:
INGENIEROS AMBIENTALES**

**TEMA:
EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
UTILIZANDO *Trichoderma* sp. Y *Bacillus pumilus*, MEDIANTE EL SISTEMA DE
BIOPILAS A ESCALA DE LABORATORIO**

**AUTORES:
JONATHAN DAVID CRUZ APUNTE
JONATHAN RAFAEL LINCANGO TUQUERRES**

**TUTOR
PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR**

Quito, marzo del 2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros Jonathan David Cruz Apunte con documento de identificación N.º 172356103-9 y Jonathan Rafael Lincango Tuquerres con documento de identificación N.º 171645741-9, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: **EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO UTILIZANDO *Trichoderma sp.* Y *Bacillus pumilus*, MEDIANTE EL SISTEMA DE BIOPILAS A ESCALA DE LABORATORIO**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIEROS AMBIENTALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Jonathan David Cruz Apunte
172356103-9



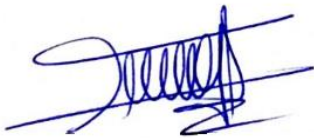
.....
Jonathan Rafael Lincango Tuquerres
171645741-9

Quito, marzo 2021

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR/A

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Trabajo Experimental, **EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO UTILIZANDO *Trichoderma sp.* Y *Bacillus pumilus*, MEDIANTE EL SISTEMA DE BIOPILAS A ESCALA DE LABORATORIO**, realizado por Jonathan David Cruz Apunte y Jonathan Rafael Lincango Tuquerres, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo 2021



.....
PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR

171842722-0

DEDICATORIA

Este trabajo experimental dedicó a la memoria de mi padre Hugo Cruz que desde el cielo me cuida y protege, que con su forma de ser jovial y alegre supo siempre apoyarme y transmitirme sus enseñanzas para enfrentarme al mundo, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, se que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. A mis hermanos Pau, Santy y Romel que con sus enseñanzas, apoyo y guía pude llegar a cumplir este objetivo y finalmente dedicó a mi madre querida Blanca Apunte que con su cariño, confianza y apoyo incondicional permitió que logré culminar mi carrera profesional.

David Cruz.

Este nuevo logro de mi vida se la dedico en primera instancia a Dios por permitirme alcanzar con gran esfuerzo y dedicación, siempre guiándome por el buen camino. A mi madre Carmen por estar siempre a mi lado, apoyándome, dándome las fuerzas para seguir, demostrándome ese amor de madre y de amiga, dándome la mano cuando ya no avanzaba y siempre estar ahí cuando más la necesitaba en esas noches frías y noches de desvelo por estar en esos momentos difíciles de mi vida.

A mi padre Rafael por ser un hombre luchador, dándome esos consejos de padre de amigo, esas ganas de ser un buen hombre de cabeza, de siempre sacar en adelante a la familia y por siempre estar pendiente del hogar. A mi hermano Edison por ser un amigo y hermano mayor incondicional por estar en esos momentos de mi carrera, de vida y siempre guiándome por el buen camino, haciéndome aprender de mis errores y dándome consejos para seguir y mirar hacia el horizonte. A mi hermano Alex por estar siempre conmigo sacándome risas de las locuras que realizamos, y por

enseñarme el valor de tener un hermano menor, con el fin de guiarle y que aprenda de sus errores.

¡Los amo hermanos de mi vida!

A mi sobrina que sus travesuras me saco siempre una sonrisa a pesar de los momentos tristes y difíciles que estuve. Aunque no esté cerca sé que desde lejos con mi hermano y mi cuñada siempre nos recuerda y nos sacara más sonrisas y momentos felices. A mis amigos y amigas de la carrera por enseñarme día a día cada situación mala o buena que se presentaba en la Universidad dentro, fuera y en transcurso de mi vida.

“Te darás cuenta que lo que hoy parece un sacrificio, mañana terminara siendo el mayor logro de tu vida”

FE, SABIDURIA Y FORTALEZA

Jonathan Rafael Lincango Tuquerres

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi madre querida Blanca Apunte por su esfuerzo económico, perseverancia y paciencia para cumplir esta meta, a mis hermanos: Pau por enseñarme a nunca rendirme , Santy por indicarme el camino de creer en mi mismo, Romel que con su sabiduría supo guiarme para ser un hombre de bien sin todos ellos no se podría haber cumplido este objetivo y agradezco de todo corazón a mi novia María José por la paciencia, el apoyo moral y económico que me supo dar y finalmente agradezco a Dios que me dio la vida y sabiduría para cumplir uno de los escalones de mi vida.

Sin dejar de lado agradezco a mi tutora de tesis Ing. Patricia Gutiérrez Msc. por brindarnos sus conocimientos científicos, permitiéndonos direccionar nuestro trabajo en sendas de la ciencia y tecnología. Agradezco a mi compañero de tesis Jonathan por su empeño y dedicación para poder concluir el presente trabajo. Por otra parte, agradezco al personal del laboratorio CTASCAL por darnos todo el apoyo y soporte y finalmente agradezco a Carlos Simba que de una u otra manera me brindo su colaboración y amistad por todo los años de carrera universitaria.

David Cruz.

Quiero agradecer a mi Papito Dios por permitirme alcanzar cada meta en mi vida, a pesar de adversidades y situaciones que se presentaron en mi vida y cambios radicales, quiero agradecerle por siempre guiarme por el buen camino. Quiero agradecer a mis padres que con su esfuerzo y dedicación supieron sacarme adelante a pesar de tantas situaciones bajas, siempre me dieron todo y me enseñaron el esfuerzo de conseguir las cosas con lucha y con la bendición de Dios todo se puede conseguir.

Quiero agradecer a mis hermanos en especial a mi hermano mayor que siempre me dio las ganas de luchar y seguir adelante desde pequeño nunca me dejó solo y hasta el día de hoy siempre sigue con nosotros, pero esta vez con su familia (Gaby y Anthonella) y mi hermano menor por todas las locuras y risas de cada día. También agradezco al laboratorio CTASCAL por permitirnos usar sus instalaciones y sus equipos para el análisis de las muestras para la finalización del trabajo experimental y al Ing. Cesar Espinoza por ayudarnos y tener la paciencia para resolver todas nuestras inquietudes en el proceso de la investigación.

A mi tutora la Ing. Patricia Salazar por su excelente guía en el transcurso de la investigación, siendo un apoyo y brindándonos su tiempo y paciencia para la conclusión del mismo. A mi compañero de tesis David Cruz por estar en estos momentos de desarrollo de la tesis en las que con su paciencia y dedicación supo comprenderme y llegar a poder tener soluciones en cada momento difícil del transcurso de la investigación.

A una persona muy especial que con el tiempo ya no se encuentra conmigo, pero que en esos momentos difíciles siempre estuvo ahí enseñándome, apoyándome y acompañándome cada día de las cuales me enseñó muchas cosas de la vida.

“Con sabiduría se construye la casa; con inteligencia se echan los cimientos”

Proverbios 24:3

FE, SABIDURIA, FORTALEZA Y AMOR

Jonathan Rafael Lincango Tuquerres

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	4
2.1.	Objetivo General	4
2.2.	Objetivos Específicos	4
3.	MARCO TEÓRICO	5
3.1.	Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH).....	5
3.2.	Metodología para Determinar TPH en Suelo	5
3.2.1.	Extracción	5
3.2.2.	Separación.....	6
3.2.3.	Cuantificación	6
3.3.	Impacto de Hidrocarburos Totales de Petróleo al Ambiente	6
3.3.1.	Contaminación de Suelos por Hidrocarburos Totales de Petróleo	7
3.4.	Legislación Ambiental	7
3.4.1.	Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA) 8	
3.4.2.	Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAHOE).....	8
3.5.	Biodegradación.....	9
3.5.1.	Definición	9
3.5.2.	Mecanismos de Biodegradación (Sistemas de Biodegradación)	10
3.5.2.1.	Fitorremediación.	10
3.5.2.2.	Bioventing.	10
3.5.2.3.	Biosparging.	11
3.5.2.4.	Compostaje.....	11
3.5.2.5.	Land Farming.	11
3.5.2.6.	Biopilas.....	12
3.5.3.	Microorganismos para Biodegradación de Petróleo en Suelos.....	13
3.5.3.1.	Hongos Biodegradadores.	14
3.5.3.1.1.	Trichoderma sp.	15
3.5.3.2.	Bacterias Biodegradadoras.	15
3.5.3.2.1.	Bacillus pumilus.	16
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1.	Fase de Campo	17
4.1.1.	Georreferenciación de la Recolección del Suelo	17

4.1.2. Obtención del Hidrocarburo	18
4.2. Fase de Laboratorio	18
4.2.1. Construcción de Biopilas	18
4.2.2. Caracterización del Suelo	18
4.2.2.1. Textura.....	18
4.2.2.2. Porcentaje de Peso Húmedo y de Materia Orgánica.	19
4.2.3. Esterilización del Suelo	20
4.2.4. Instalación del Ensayo	21
4.2.4.1. Preparación del Suelo y Adición del Hidrocarburo (Diésel).....	21
4.2.4.2. Inoculación de los Microorganismos.	21
4.2.4.3. Tratamiento del Ensayo.....	22
4.2.4.4. Disposición del Tratamiento.	22
4.2.5. Medición de Parámetros Físico-Químicos.....	23
4.2.6. Análisis del TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo)	23
4.2.6.1. Extracción de TPH de las Muestras de Suelo.....	24
4.2.6.2. Análisis Cuantitativo de TPH de las Muestras de Suelo.	25
4.2.7. Diseño Experimental.....	28
4.2.7.1. Análisis Estadístico.	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Caracterización del Suelo.....	30
5.2. Análisis Físico-Químico.....	30
5.2.1. Temperatura	30
5.2.2. pH.....	31
5.3. Análisis Cuantitativo de TPH en las Muestras de Suelo	32
5.3.1. Identificación de Picos	32
5.3.2. Resultados Obtenidos de la Cuantificación de los TPH Utilizando el Cromatógrafo de Gases.	34
5.4. Análisis Estadístico	40
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
6.1. Conclusiones	45
6.2. Recomendaciones.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA	47
8. ANEXOS.....	56
8.1. Anexos A Materiales y Metodología	56
8.1.1. Anexo A1 toma de Muestra	56
8.1.2. Anexo A2 Tamizado de Muestra	57
8.1.3. Anexo A3 Textura	57
8.1.4. Anexo A4 Porcentaje de Humedad y Materia Orgánica.....	58

8.1.5.	Anexo A5 Esterilización.....	58
8.1.6.	Anexo A6 Desinfección y Adecuación.....	59
8.1.7.	Anexo A7 Homogenización del Suelo.....	59
8.1.8.	Anexo A8 Inclusión de los Microorganismos	60
8.1.9.	Anexo A9 pH y Temperatura.....	61
8.1.10.	Anexo A10 Extracción de TPH en Muestras de Suelo	62
8.1.11.	Anexo A11 Cuantificación de TPH	63
8.2.	Anexos B Resultados	64
8.2.1.	Anexo B1 Reportes Cromatográficos de Estándares	64
8.2.2.	Anexo B2 Reportes Cromatográficos de los Tratamientos	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 LÍMITES MÁXIMOS DE TPH	9
TABLA 2 SELECCIONES DE CRITERIOS PARA LA APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA ..	13
TABLA 3 COORDENADAS DE RECOLECCIÓN DEL SUELO	17
TABLA 4 CONCENTRACIONES PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	22
TABLA 5 TRATAMIENTO DEL ENSAYO.....	22
TABLA 6 CONDICIONES IDEALES PARA EL DESARROLLO CROMATOGRÁFICO	27
TABLA 7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
TABLA 8 TEMPERATURA DE CADA TRATAMIENTO [°C]	30
TABLA 9 pH DE CADA TRATAMIENTO	31
TABLA 10 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS 24 PICOS DE LOS TPH DE LOS ESTÁNDARES DEL MÉTODO DESARROLLADO	34
TABLA 11 CORRESPONDENCIA LINEAL ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y EL ÁREA	35
TABLA 12 MUESTRAS CON TRATAMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE 10000 PPM.....	38
TABLA 13 MUESTRAS CON TRATAMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE 40000 PPM.....	39
TABLA 14 COEFICIENTE DE VARIACIÓN	40
TABLA 15 CUADRO DE ANÁLISIS DE LA VARIANZA	40
TABLA 16 AGRUPACIÓN DE INFORMACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO TUKEY CON UN 95% DE CONFIANZA . COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS	41
TABLA 17 PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON CONCENTRACIÓN 10000 PPM	43
TABLA 18 PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON CONCENTRACIÓN 40000 PPM	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 SISTEMAS DE BIOPILA	12
FIGURA 2 MAPA DEL LUGAR DE LA TOMA DE MUESTRA	17
FIGURA 3 TRIÁNGULO TEXTURAL	19
FIGURA 4 ESQUEMA EXPERIMENTAL DE LAS 14 CAJAS DE LOS TRATAMIENTOS	22
FIGURA 5 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE TPH BASADO EN EL MÉTODO 3540C SOXHLET EXTRACTION	25
FIGURA 6 CROMATOGRAMA DE HEXANO	28
FIGURA 7 CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE DIÉSEL DE 25MG/ML	33
FIGURA 8 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TPH	35
FIGURA 9 CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA A11 (1) DEL TRATAMIENTO DE 10000 PPM CON TRICHODERMA SP.	36
FIGURA 10 CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA B11 (1) DEL TRATAMIENTO DE 10000 PPM CON B. PUMILUS	37
FIGURA 11 CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA B13 (1) DEL TRATAMIENTO DE 10000 PPM CON B. PUMILUS	37
FIGURA 12 DIAGRAMA DE BARRA DE LOS PORCENTAJES DE REMOCIÓN DE TPH DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	42

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1 PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL SUELO FUENTE: (RODRÍGUEZ & ANA, 2015).	20
ECUACIÓN 2 PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO FUENTE: (RODRÍGUEZ & ANA, 2015).	20
ECUACIÓN 3 ECUACIÓN DE LA RECTA.	26
ECUACIÓN 4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA EN MG/KG FUENTE: (MÉNDEZ , 2011).	27

RESUMEN

La presente investigación abordó el proceso de biodegradación de suelos contaminados por TPH (hidrocarburos totales de petróleo), debido al grave impacto que este ocasiona en el medio ambiente, la difícil restauración y los altos costos de descontaminación. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la capacidad de remoción de TPH utilizando un sistema de biopilas con *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus*. Para la extracción y cuantificación del TPH, se utilizaron las metodologías EPA's 3540C SOXHLET EXTRACTION y 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC/FID respectivamente. Mediante un análisis estadístico se usó un DCA en arreglo factorial 3×2 y una prueba Tukey al 5% para evaluar el mejor de los tratamientos. De acuerdo con el análisis realizado se concluye que los porcentajes de remediación de TPH, para una concentración de 10000 ppm fueron: con *Trichoderma* sp. un porcentaje de remoción del 65,15% y con *Bacillus pumilus* un porcentaje del 50,68%. Por otra parte, para una concentración de 40000 ppm, fueron: con *Trichoderma* sp. un porcentaje de remoción del 18,63% y con *Bacillus pumilus* un porcentaje del 18,67%, el mejor tratamiento con el mayor porcentaje de remoción es utilizando *Trichoderma* sp. a una concentración de 10000 ppm.

ABSTRACT

This research addressed the biodegradation process of soils contaminated by TPH (total petroleum hydrocarbons), because of the serious impact that this causes in the environment, the difficult restoration, and the high costs of decontamination. The main objective of this research was to evaluate the TPH removal capacity using a biopile system with *Trichoderma* sp. and *Bacillus pumilus*. For the extraction and quantification of TPH, the methodologies EPA's 3540C SOXHLET EXTRACTION were used and 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC / FID respectively. By means of a statistical analysis a DCA in factorial arrangement 32 and a Tukey test at 5% were used to evaluate the best of the treatments. According to the analysis carried out, it is concluded that the remediation percentages of TPH, for a concentration of 10,000 ppm they were: with *Trichoderma* sp. a removal percentage of 65.15% and with *Bacillus pumilus* a percentage of 50.68%. On the other hand, for a concentration of 40000 ppm, they were: with *Trichoderma* sp. a removal percentage of 18.63% and with *Bacillus pumilus* a percentage of 18.67%, the best treatment with the highest percentage of removal is using *Trichoderma* sp. at a concentration of 10000 ppm.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por hidrocarburos ha sido estudiada desde un siglo atrás, debido al incremento y demanda de la obtención de petróleo en todo el mundo. Eventos accidentales o provocados por la producción de petróleo costa afuera (off shore) y en el transporte de petróleo por medio marítimo (buques cisternas) fueron los principales actores de la contaminación de las fuentes hídricas. La contaminación de suelo debido a la producción de petróleo en tierra (on shore) causado por la explotación, almacenamiento y transporte hacia los puertos y refinerías también contribuye a la contaminación de la naturaleza terrestre (Zamora & Ramos, 2012).

Al inicio de la década de los setenta el Ecuador permitió empezar la explotación y exportación de petróleo, favoreciendo al desarrollo económico del país por los altos precios del petróleo en el mercado mundial, por lo contrario, la extracción del petróleo en el Ecuador provocó innumerables desastres en la naturaleza (Eumed.net, 2004).

En Ecuador, la entidad encargada de normar y regular los valores máximos permisibles del contenido de contaminantes en el suelo es el Ministerio del Ambiente (MAE). En el anexo 2 del libro VI del texto unificado de la legislación secundaria del MAE se norma la calidad ambiental del recurso suelo y los criterios de remediación para suelos contaminados (Ministerio del Ambiente, 2015).

En 1946, Claude E. ZoBell reveló que varios microorganismos que se hallan distribuidos por la naturaleza, tienen la facultad de utilizar los hidrocarburos como fuente de energía y carbono surgiendo nuevas técnicas para la mitigación de suelos contaminados (Briseño, 2018).

La biodegradación se fundamenta en el concepto de que los microorganismos son capaces de procesar elementos del ambiente empleándolos para su crecimiento. Esta peculiaridad es el fundamento del principio de la biodegradación; utilizar microorganismos para que atrapen sustancias contaminadas del medio ambiente y convertirlas en sustancias no tóxicas. Algunos microorganismos son excelentes degradadores de moléculas complejas (Capital Natural y Analisis CB, 2011).

Entre las ventajas principales de la biodegradación podemos citar: bajos costos y la disposición de tecnologías más benéficas para el ambiente, por otra parte, las desventajas que se pueden mencionar son: el período de tratamiento es mayor y se requiere un suelo que favorezca el crecimiento de los microorganismos (Biorremediacion, 2012).

A lo largo de la historia se han producido varios accidentes y eventos desfavorables para el medio ambiente debido a la explotación, almacenamiento, transporte y distribución de este recurso; para esto se debe tomar medidas preventivas, mitigantes y de respuesta inmediata ante desastres provocados por la utilización del petróleo (BBC, 2015).

Los hidrocarburos en contacto con el suelo afectan las propiedades químicas y físicas como: el pH, pérdida de crecimiento de flora y fauna, textura y permeabilidad; además. Existen varios métodos para poder mitigar y solucionar estos problemas en áreas que han sido afectadas por hidrocarburos siendo una de las más importantes la biológica en cuanto aspectos económicos, seguros y ambientalmente accesibles (Cando, 2011).

Por otra parte, para tener mejores resultados en los tratamientos biológicos existen tecnologías que favorecen el funcionamiento de biodegradación de hidrocarburos como lo es el sistema de biopilas, esta tecnología puede degradar varios contaminantes orgánicos, pero se encuentran entre los mas estudiados los hidrocarburos totales de petróleo. Además, es una tecnología atractiva para los empresarios por que ha sido implementada con éxito en la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos y sus bajos costos de construcción (Delgadillos, 2018).

La presente investigación se basa en un tratamiento biológico que degrada hidrocarburos totales de petróleo (TPH) presente en suelos contaminados, con el fin de identificar el porcentaje de degradación de TPH en cada tratamiento, verificando su mejor rendimiento en el proceso de biodegradación (Martinez, Perez, Pinto, Gurrola, & Osorio, 2011).

La investigación busca solucionar problemas donde se presenten suelos contaminados con niveles bajos y altos de TPH, con la intención de cumplir con los niveles máximos permisibles por la legislación ecuatoriana (Cando, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar la capacidad de remoción de TPH utilizando un sistema de biopilas con *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir un sistema de biopila a escala de laboratorio adicionando *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus*.
- Determinar la capacidad de *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus* para la biodegradación de TPH a concentraciones de 10000 y 40000 ppm.
- Determinar el porcentaje de remoción de TPH aplicando un sistema de biopilas a escala de laboratorio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH)

Es un término que permite explicar una variedad de compuestos químicos provenientes del petróleo y/o productos químicos mezclados, por lo tanto, el TPH se encuentra conformado por carbono e hidrógeno como los elementos más importantes (Method EPA 8015B, 2002).

3.2. Metodología para Determinar TPH en Suelo

Para la medición de TPH existen diferentes procedimientos analíticos entre los cuales se puede citar: la cromatografía de gases, el método gravimétrico y la espectroscopia infrarroja (espectroscopia IR). Además, se pueden obtener concentraciones diferentes gracias a los solventes que se aplican en cada procedimiento. Los métodos y etapas conocidos para determinar el TPH en suelo contaminado son: extracción, cuantificación y detección. (Servicios Analíticos Generales S.A.C, 2019).

3.2.1. Extracción

Este método puede ser de 3 tipos: agitación - centrifugación, soxhlet y microondas, cada una de estas depende del porcentaje de recuperación al momento de la extracción.

En la Norma US EPA, se menciona que el método de agitación y centrifugación, se basa en separar los sólidos presentes gracias a la acción del solvente, de igual manera para la extracción con el equipo soxhlet asegura un contacto directo con la muestra de suelo y del solvente de modo que se obtiene los resultados deseados (Romero D. , 2010).

3.2.2. Separación

La Norma US EPA indica que se puede separar en diferentes fracciones un extracto o muestra de suelo contaminada con hidrocarburo, permitiendo más rápida la lectura en este proceso, ya sea por cromatografía en columna o espectrometría de infrarrojo (Romero D. , 2010).

3.2.3. Cuantificación

Un análisis de separación y cuantificación se puede realizar mediante un equipo de cromatografía de gases, este método permite clasificar e identificar los TPH, pero tiene algunos inconvenientes en cuanto al costo y al tiempo del proceso. Para un posible análisis se necesita una extracción previa que en cierta medida implica costos en solventes, varios de estos son controlados por la Agencia Reguladora, puesto que son peligrosos para la persona que lo manipula. Para poder cuantificar siempre se diseña una curva de calibración que permite una relación de concentración con el área de bandas de absorción (Romero D. , 2010).

3.3. Impacto de Hidrocarburos Totales de Petróleo al Ambiente

Las concentraciones de TPH en los medios naturales y de origen antropogénico son responsables de impactos ambientales que provocan alteraciones y modificaciones en los ecosistemas, algunos de estos son: gases de efecto invernadero, derrame de petróleo y combustibles fósiles en el agua, afectación de toda la zona biótica y abiótica en el suelo (Hall, Tharakan, Hallock, Cleveland, & Jefferson, 2003).

Los compuestos de TPH suelen disociarse en compuestos más simples dependiendo de su composición química, sin embargo, se pueden volatilizar y filtrarse llegando a varios sitios donde su afectación sea más extensa y producir una alteración que no puede ser remediada (U.S. Department of Health and Human Services, 1999).

3.3.1. Contaminación de Suelos por Hidrocarburos Totales de Petróleo

En un suelo contaminado se producen varios procesos físico-químicos, que depende del hidrocarburo que fue derramado y las condiciones ambientales del sitio. Los TPH provocan una alta toxicidad que desfavorece la estructura de proteínas provocando una deshidratación y una desnaturalización de las células, por lo tanto, perjudican a los microorganismos que habitan en el suelo (Lopez, y otros, 2006).

Los hidrocarburos totales de petróleo generan varios medios de afectación directa en el suelo como: cambios de pH y salinidad, disminución en la sujeción de nutrientes y humedad. La toxicidad de cada clase es diferente, pero los más tóxicos son los que tienen menor peso molecular (Velasquez, 2017).

La contaminación en el suelo también produce consecuencias indirectas mismas que pueden causar efectos negativos en las plantas, ya que estas absorben los minerales del suelo, además debido a que los contaminantes son tóxicos estropean la estructura del suelo quienes pierden grandes cantidades de nutrientes y materia orgánica. En suelos productores, los contaminantes impiden la producción de siembra y cosecha perjudicando al ser humano a la parte social y económica de esta actividad (Velasquez, 2017).

3.4. Legislación Ambiental

La investigación toma como antecedentes al Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA), libro VI, anexo 2 y el Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAHOE), como normativas ambientales vigentes:

3.4.1. *Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA)*

El TULSMA LIBRO VI ANEXO 2 (2015), capítulo 4, contempla los requisitos de normas de aplicación, perspectivas de calidad del suelo y criterios de remediación.

Los responsables de la contaminación al suelo producidos por: derramamientos, fugas, acopio, etc. Tendrá que proceder a la recuperación del sitio afectado, analizando los efectos y criterios de remediación de suelos contaminados, que dispone en la norma, además de un seguimiento de acciones de remediación hasta lograr los valores establecidos (TULSMA LIBRO VI ANEXO 2, 2015).

En cuanto a los criterios de calidad de suelo y perspectivas de remediación se dispone de acuerdo al manejo del suelo (comercial, residencial, agrícola, e industrial), que comprende un propósito de evaluar los niveles máximos de contaminantes de los diferentes tipos de suelo en proceso de restauración (TULSMA LIBRO VI ANEXO 2, 2015).

3.4.2. *Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAHOE)*

Según el Ministerio de Hidrocarburos (2010), RAHOE menciona en el capítulo XII los límites permisibles y el capítulo XIV sanciones y denuncias, de manera que los sujetos de control y sus operadoras, para liberar emisiones a la atmosfera, desechos sólidos y líquidos en el ambiente, se debe efectuar los límites máximos permisibles que se encuentran en los Anexos No. 1, 2 y 3 de esta norma, mediante el cual se establece el programa mínimo para el seguimiento interno ambiental y se informará a la Subsecretaría Ambiental acorde a la periodicidad dispuesta en el artículo 12 (Ministerio de Hidrocarburos , 2010).

Las infracciones que caen en objeto socio-ambiental, mientras se desarrollen las diligencias hidrocarburíferas: los representantes de control y protección ambiental son sometidas a conocimientos y resoluciones del Director de Hidrocarburos, estarán penados de acuerdo con el artículo 77 de la Ley de Hidrocarburos. También de una compensación por los perjuicios y daños producidos (Ministerio de Hidrocarburos , 2010).

Tabla 1

Límites máximos de TPH

PARÁMETROS	EXPRESADO EN	UNIDAD	USO AGRÍCOLA	USO INDUSTRIAL	ECOSISTEMAS SENSIBLES
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	<2500	<4000	<1000

Nota: Límites permisibles de TPH a consecuencia del uso del suelo en cada aspecto de la industria hidrocarburífera. Tomado de (Ministerio de Hidrocarburos , 2010).

3.5. Biodegradación

3.5.1. Definición

La biodegradación es un proceso o técnica que utiliza microorganismos vivos o genéticamente modificados para convertir sustancias tóxicas en compuestos menos tóxicos o no tóxicos (Gooch JW, 2011). Por lo tanto, por definición la biodegradación es una serie de pasos y técnicas las cuales se centran en la utilización de microorganismos como hongos, plantas y bacterias con el propósito de eliminar sustancias tóxicas introducidas por la actividad del hombre ya sea en agua o en suelo.

3.5.2. *Mecanismos de Biodegradación (Sistemas de Biodegradación)*

En la actualidad existe un sin número de sistemas de biodegradación ya sean in situ y ex situ, los cuales se han ofertado en el mercado encaminados únicamente a la remediación de lugares contaminados; dentro de los contaminantes tratados con mayor periodicidad se hallan los TPH los cuales tienen resultados cuantitativos y con menores costos económicos.

3.5.2.1. Fitorremediación.

La Fitorremediación in situ ocupa un puesto importante para la biodegradación de suelos contaminados, se fundamenta en la composición de plantas y comunidades microbianas esta asociación es prometedora para la biodegradación ya sea de suelos y vías fluviales contaminados. Esta técnica tiene varias limitaciones una de ellas es la accesibilidad a la zona contaminada, sin embargo, la capacidad de las plantas para extraer las sustancias tóxicas es gracias a sus actividades degradantes por factores físicos y químicos asociados con las raíces (Harvey, Campanella, & Castro, 2002).

3.5.2.2. Bioventing.

La técnica de bioventing o también conocida como bioventilación es un procedimiento de remediación de suelos in situ. Consiste en suministrar oxígeno mediante la utilización de bombas, de esta manera se estimula el crecimiento microbiano incrementando las actividades de los microbios autóctonos. Para tener mejores resultados se modifican las condiciones del suelo añadiendo nutrientes y humedad consiguiendo una mejora en la biodegradación con el objetivo final de transformar los contaminantes a un estado inofensivo (Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016).

Esta práctica ha ganado popularidad en su utilización para la biodegradación de suelos contaminados especialmente en la restauración de sitios contaminado por sustancias petrolíferas in situ (Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016).

3.5.2.3. Biosparging.

El biosparging es una técnica de remediación in situ, es muy parecida a la bioventing que tienen como objetivo inyectar aire en suelos contaminados para la eliminación de toxinas, sin embargo, a diferencia del bioventing el aire se inyecta en zonas saturadas e insaturadas. El biosparging se ha manejado abundantemente en el tratamiento de acuíferos contaminados con productos del petróleo, especialmente diésel y queroseno (Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016).

3.5.2.4.Compostaje.

El compostaje es un proceso de biodegradación ex situ donde los compuestos tóxicos orgánicos se biodegradan, se biotransforma o se estabilizan, los principales actores del proceso de compostaje son las bacterias mesófilas y termófilas alcanzando altas temperaturas y eliminando los patógenos recuperando la calidad de suelos contaminados, esta metodología se usa principalmente en la recuperación de suelos contaminados ya sea por HAP's (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) y TPH (Alexander, Bloom, Hopwood, & Hull, 2000).

3.5.2.5.Land Farming.

El land farming es un proceso de biodegradación ex situ, en su gran mayoría, pero dependiendo del contexto de la situación se puede considerar con in situ. Esta técnica se considera una de las menos costosas debido a que es muy fácil de construir y por su mínimo uso de equipos para operar. El land farming consiste en que los suelos que contengan sustancias tóxicas como

hidrocarburos se ubiquen a una altura de 0.3 a 1.0 m, se adicionan nutrientes y se mezclan con regularidad (Kumar & Yadav, 2018).

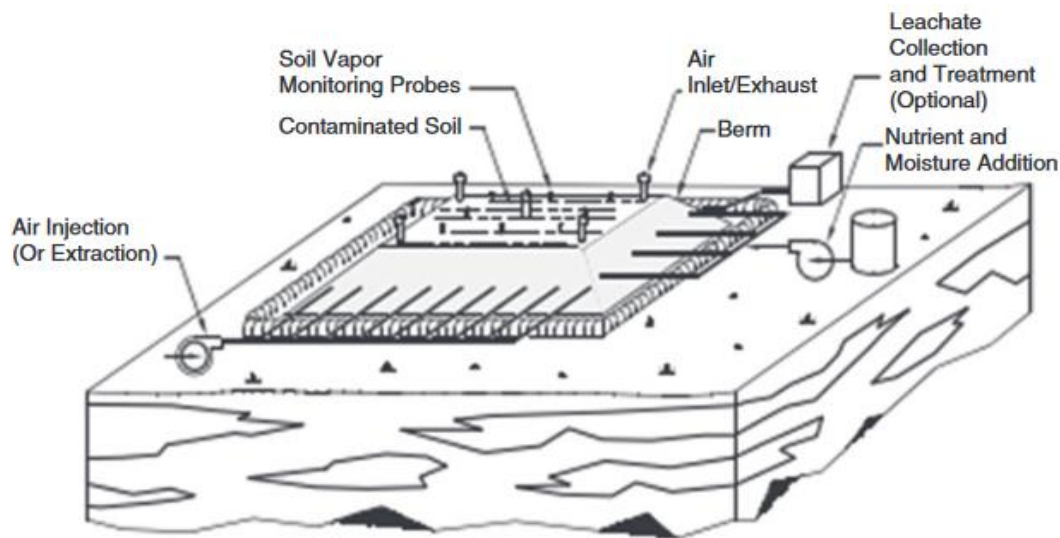
3.5.2.6.Biopilas.

El sistema de biopilas es una técnica de remediación de suelos ex situ. Consiste en realizar montañas de suelos contaminados mezclados con agua y nutrientes además con la presencia de aireación donde las comunidades microbianas se estimulan, las biopilas se usan con mayor frecuencia en la remediación de hidrocarburos de petróleo (Kumar & Yadav, 2018).

Cada vez esta tecnología toma más valor al momento de mitigar la contaminación de los suelos, esto se debe a que tiene diferentes características particulares como son: la construcción y la rentabilidad. Permite una biodegradación efectiva donde la condición de los nutrientes, la temperatura y la aireación estén adecuadamente controlados (Azubuike, Chikere, & Okpokwasili, 2016).

Figura 1

Sistemas de Biopila



Nota: Tomado de (Kumar & Yadav, 2018).

Para el desempeño eficaz de las biopilas se debe tomar en cuenta una serie de criterios a seleccionar para su construcción como se indica la tabla 2.

Tabla 2

Selecciones de criterios para la aplicación de la tecnología

Categoría	Condición
TPH	$\leq 50,000$ mg/kg
Bacterias Heterótrofas	$\geq 1,000$ UFC/g en suelo seco
pH	6 a 9
Contenido de Humedad	70 a 95 % de capacidad de campo
Bajo contenido de arcilla y limo	Volumen de huecos del suelo $\geq 25\%$
C:N:P:K	100:15:1:1
Metales Tóxicos	$\leq 2,500$ mg/kg

Nota: Criterios recomendables para la utilización de la tecnología de biopilas. Tomado de (Naval Facilities Engineering Service Center Port Hueneme, California, 1996).

3.5.3. Microorganismos para Biodegradación de Petróleo en Suelos

La utilización de microorganismos para la biodegradación de suelos contaminados ha contribuido a gran escala a la implementación de esta tecnología. Según Higa y Parr (1994) los microorganismos eficientes consisten en cultivos mixtos de microorganismos beneficiosos que pueden ser de origen natural autóctonos, además las investigaciones han demostrado que la inoculación de estos microorganismos en el suelo puede mejorar la calidad y mitigar la contaminación.

Los microorganismos eficientes residen en la elección de especies predominantes de bacterias y hongos donde la capacidad de degradación de las comunidades microbianas aumenta

la eficiencia de remediación transformando las sustancias tóxicas en menos tóxicas o la inexistencia de dichos compuestos (Dellagnezze, Gomes , & de Oliveira , 2018).

3.5.3.1.Hongos Biodegradadores.

Una nueva tecnología que atrae a la comunidad científica es la biodegradación mediante hongos, debido a las características que presentan estos microorganismos que cuentan con un sistema enzimático bien evolucionado que le permite crecer en cualquier medio, estos beneficios les otorgan las facilidades para degradar cualquier tipo de sustancias que pueden ser absorbidas y metabolizadas en sus células (Sardrood , Goltapeh , & Varma).

Estas características evolutivas ayudan a la degradación de sustancias tóxicas que son tomadas como nuevas fuentes de energía, además se cree que los hongos son mejores que las bacterias en el contexto que pueden crecer en condiciones de estrés ambiental como: deficiencia de nutrientes y pH bajos, por lo tanto se espera que los hongos puedan sobrevivir en condiciones tóxicas que no serían tolerables para la mayoría de las bacterias (Sardrood , Goltapeh , & Varma).

Se han encontrado muchos géneros de hongos que contienen especies capaces de metabolizar hidrocarburos y algunos de ellos pueden emplearse en la biodegradación de zonas contaminadas por petróleo. Estos géneros de hongos incluyen: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Graphium*, *Hansenula*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sphaeropsidales*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichoderma* y *Trichosporon* (Sardrood , Goltapeh , & Varma).

3.5.3.1.1. *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* fue explicado por primera vez en 1794 por Persoon posteriormente, Rifai hizo la primera asociación en especies agregadas que se maneja hasta la actualidad, siendo una especie de difícil identificación por presentar similitudes morfológicas. Son hongos saprofitos del suelo y de la madera con un crecimiento muy acelerado, las especies de este género se pueden encontrar con mucha facilidad en cualquier parte del globo terráqueo, pero abundan en sitios donde existe mayor cantidad de materia orgánica en descomposición (Martínez & Infante, 2013).

Trichoderma sp. es un género de hongos filamentosos que residen en el suelo, son altamente resistentes a una variedad de tóxicos como metales pesados, compuestos organometálicos, efluentes de curtiembres, químicos nocivos como el cianuro y son capaces de resistir amplios intervalos de temperatura esto los convierte en un género fuerte para el proceso de mitigación de sustancias tóxicas (Tripathi, Singh, & Mishra, 2013).

Las especies de *Trichoderma* sp. han sido reveladas como biocatalizadores capacitados para la degradación de contaminantes orgánicos incluyendo la biodegradación de suelos contaminados con el diésel (Andreolli, Lampis, & Brignoli, 2016).

3.5.3.2. Bacterias Biodegradadoras.

Las comunidades bacterianas son microorganismos más populares al momento de la degradación de hidrocarburos de petróleo y se consideran como los mayores degradadores de derrames de petróleo, tienen la capacidad de alimentarse exclusivamente de los hidrocarburos (Mahmoud & Bagy , 2018).

Existen un sinnúmero de bacterias degradadoras de petróleo aquí se mencionan algunas de ellas *Yokenella* sp., *Alcaligenes* spp., *Roseomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Providencia* sp., *Sphingobacterium* sp., *Capnocytophaga* sp., *Moraxella* sp. y *Bacillus* sp., se les conoce como degradadores potenciales de hidrocarburos (Borah , 2018).

3.5.3.2.1. *Bacillus pumilus*.

B. pumilus es un microorganismo no patógeno que se halla ya sea en el suelo o agua; también conocido como la cepa QST 2808, además, es una bacteria formadora de esporas su forma es muy parecida a bastones el *B. pumilus* es una bacteria Gram positiva, aeróbica y posee actividad antifúngica y antibacteriana (Chamberlain & Chang, 2012).

Según Patowary, Saikia, y Kalitam (2014). En su estudio demostró que el *B. pumilus* tiende a degradar un 84,44% de TPH a las cuatro semanas de incubación esta bacteria tiene la particularidad de producir biosurfactantes.

Los biosurfactantes son moléculas antipáticas, esta sustancia reduce la tensión superficial, lo que lleva a una mayor biodisponibilidad y posterior a una biodegradación de los hidrocarburos siendo un potencial degradante de hidrocarburos totales de petróleo (Kim, 2014).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fase de Campo

4.1.1. Georreferenciación de la Recolección del Suelo

Se geo-referenció las coordenadas del sitio donde se extrajo el suelo, se tomó una cantidad de 35 kg, ubicado en la parroquia de Lloa, cantón Quito (Anexo A1).

Tabla 3

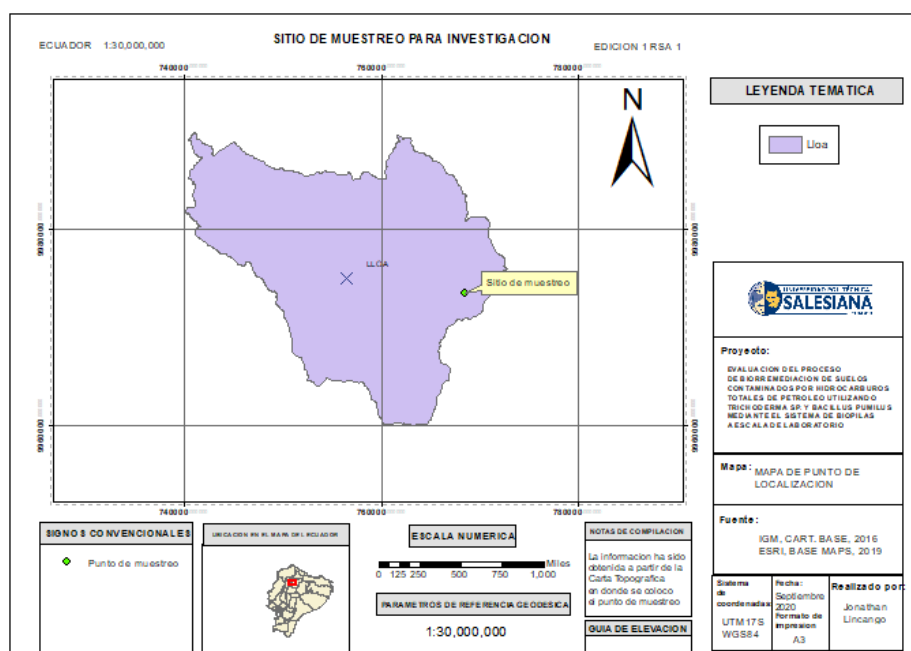
Coordenadas de recolección del suelo

Longitud	-0.240353
Latitud	-78.587314
Altitud	3083 msnm

Nota: Georreferenciación del lugar seleccionado para la recolección del suelo utilizando la App GPS altitud, 2020.

Figura 2

Mapa del lugar de la toma de muestra



Nota: Carta topográfica del sitio de muestreo en Lloa. Fuente (Los autores, 2020).

4.1.2. *Obtención del Hidrocarburo*

El hidrocarburo se adquirió en la estación de servicio Primax ubicada en la Av. Eloy Alfaro y Alamos, la cantidad de la compra fue de un galón de diésel.

4.2. Fase de Laboratorio

4.2.1. *Construcción de Biopilas*

Para la construcción de las biopilas se necesitó, dos planchas de tabla triplex de 12 mm, una libra de clavos, un tarro de cola de goma y seis metros de plástico de color negro.

Las dimensiones de las biopilas fueron de 25 cm de largo por 30 cm de ancho y una altura de 15 cm, además cada biopila se forró con una capa plástica de color negro para preservar la integridad de cada caja de madera, cada caja fue diseñada con una pendiente de 2,5% con una tolerancia de $\pm 0,5\%$ para facilitar el escurrimiento de los lixiviados.

4.2.2. *Caracterización del Suelo*

Previamente a la caracterización del suelo y la esterilización del mismo se tamizó por una malla de tamaño de 4mm para retirar objetos de mayor tamaño como: ramas, piedras y raíces (Anexo A2).

4.2.2.1. Textura.

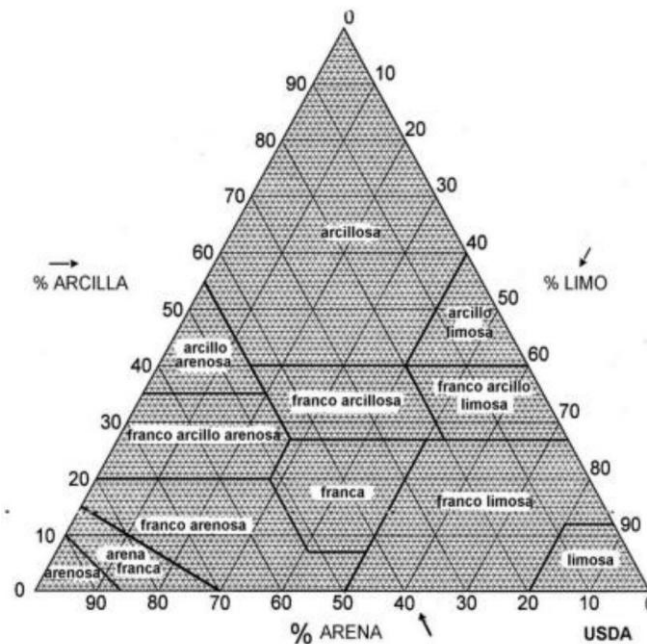
Se determinó la textura por medio del equipo de tamizado, para lo cual se pesó previamente en una balanza granataria los tamices lavados y secados. Posteriormente se colocó los tamices en el equipo de mayor a menor (1.00mm, 500 μ m, 250 μ m, 150 μ m, 63 μ m, 53 μ m y 38 μ m) hasta completar los 8 tamices, se dispuso de 200g de muestra de suelo seco, que fue colocada en el

primer tamiz, se cubrió y se sujetó, se revisó que todos los tamices se encuentren en orden y alineados, se encendió el equipo por 1 minuto.

Luego se retiró cada tamiz, se procedió a pesar cada uno y anotar el peso de cada recipiente. Por último, se midió el porcentaje de cada porción y se estableció el tamaño de partículas, la textura y tipo de suelo de la muestra con la ayuda del diagrama textural de la USDA donde se encuentra representado por el triángulo textural (Anexo A3).

Figura 3

Triángulo textural



Nota: Triángulo de las clases texturales del suelo. Tomado de (SSDS, 1993).

4.2.2.2. Porcentaje de Peso Húmedo y de Materia Orgánica.

Para la determinación de estos dos parámetros se tomó una muestra de 100g de suelo. Se pesó 5 crisoles utilizando una balanza analítica añadiendo una cantidad de 20g por cada crisol y se volvió a pesar. Los crisoles fueron introducidos a un horno a 105 °C por 24 horas, luego se retiró

del horno y se llevaron al desecador por 15 minutos. Finalmente se pesaron los crisoles y se estableció el porcentaje de peso húmedo utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{P_2 - P_3}{P_3 - P_1} \times 100$$

Ecuación 1 Porcentaje de humedad del suelo fuente: (Rodríguez & Ana, 2015).

Dónde: P_1 = Peso del crisol (g), P_2 = Peso del crisol más suelo húmedo (g), P_3 = Peso del crisol más suelo seco (g) y P_4 = Peso del crisol más ceniza (g).

Para determinar la materia orgánica se continuo con el proceso donde se colocaron los 5 crisoles a la estufa con una temperatura de 400 °C durante 16 horas aproximadamente enseguida se llevaron al desecador donde permanecieron durante una hora y finalmente se volvió a pesar, se utilizó la siguiente ecuación para obtener el porcentaje de materia orgánica (Anexos A4).

$$\text{Porcentaje de materia orgánica} = \frac{P_3 - P_4}{P_3 - P_1} \times 100$$

Ecuación 2 Porcentaje de materia orgánica del suelo fuente: (Rodríguez & Ana, 2015).

4.2.3. Esterilización del Suelo

Se realizó la esterilización de las muestras de suelo en un autoclave vertical con una temperatura de 121 °C a una presión de 105 kPa y durante un periodo de tiempo de 15 minutos, las muestras de suelo se colocaron en fundas de esterilización de 190mm × 358mm marca sigma (Anexos A5).

4.2.4. Instalación del Ensayo

El sitio, previo a realizar el ensayo, se desinfecto con cloro al 5% y se cubrió de plástico negro, esta acción se la realizó con el fin que no existiera ningún tipo de contaminación para el ensayo (Anexo A6).

4.2.4.1.Preparación del Suelo y Adición del Hidrocarburo (Diésel).

Para poder determinar la cantidad de diésel que se empleó en los diferentes tratamientos y sus concentraciones se partió desde la concentración que se quería obtener, es decir, para los tratamientos de 10000 ppm y 40000 ppm se trasformó a mg/kg, se procedió hacer una regla de tres como se detalla en el siguiente ejemplo.

$$10000 \text{ ppm} = 10000 \text{ mg/kg}$$
$$\frac{10000 \text{ mg}(\text{diesel})}{x} \qquad \frac{1 \text{ kg de suelo}}{17,5 \text{ kg de suelo}} \text{ por lo tanto,}$$
$$x = \frac{10000 \text{ mg}(\text{diésel}) \times 17,5 \text{ kg de suelo}}{1 \text{ kg de suelo}} = 175000 \text{ mg de diésel.}$$

Para preparar las muestras contaminadas de suelo se mezcló 17.5 kg de suelo esterilizado y 175 g de diésel para alcanzar una concentración de 10000 ppm por otra parte, para la obtención de una concentración de 40000 ppm se agregó 700 g de diésel en 17.5 kg de suelo esterilizado sobre un plástico negro previamente desinfectado (Anexo A7).

4.2.4.2. Inoculación de los Microorganismos.

En cada caja de madera se pesó 2.5 kg de suelo utilizando una balanza y se agregó 100 ml *Trichoderma sp.* y 100 ml de *B. pumilus* en los diferentes tratamientos, para esta medición se usó

un frasco Erlenmeyer de 400 ml y se procedió a mezclar el suelo contaminado con diésel y el microorganismo (Anexo A8).

4.2.4.3.Tratamiento del Ensayo.

En las siguientes tablas se explica los diferentes tratamientos con sus concentraciones y dosis.

Tabla 4

Concentraciones para los diferentes tratamientos

Concentraciones de TPH en ppm	Tratamientos sin Microorganismos	Tratamiento <i>Trichoderma sp.</i>	Tratamiento <i>Bacillus pumilus</i>
10000	T1	T3	T5
40000	T2	T4	T6

Nota: Tabla de concentraciones del contaminante (diésel) en los diferentes tratamientos del ensayo. Fuente (Los Autores, 2020).

Tabla 5

Tratamiento del ensayo

Tratamientos	Descripción
T1	Concentración 10000 ppm sin microorganismos
T2	Concentración 40000 ppm sin microorganismos
T3	Concentración 10000 ppm con <i>Trichoderma sp.</i>
T4	Concentración 40000 ppm con <i>Trichoderma sp.</i>
T5	Concentración 10000 ppm con <i>Bacillus pumilus</i>
T6	Concentración 40000 ppm con <i>Bacillus pumilus</i>

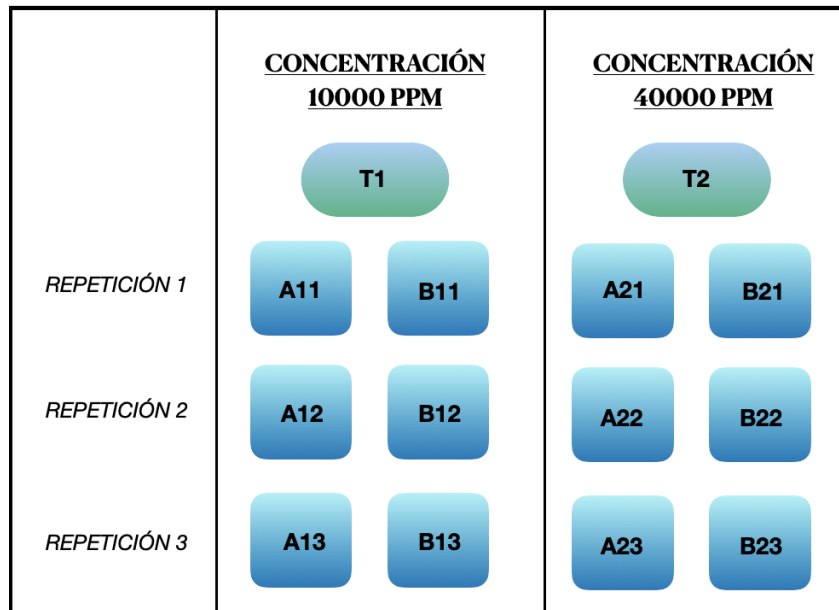
Nota: Tabla de la descripción de los diferentes tratamientos del ensayo. Fuente (Los Autores, 2020).

4.2.4.4.Disposición del Tratamiento.

En la ilustración 4 se puede observar cómo se dispuso los diferentes tratamientos y la nomenclatura que se utilizó para identificarlo.

Figura 4

Esquema experimental de las 14 cajas de los tratamientos



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

4.2.5. Medición de Parámetros Físico-Químicos

Se determinó el pH y temperatura, utilizando el equipo SG2-SevenGo pH metro medidor portátil (Mettler Toledo), estas mediciones se realizaron en el lugar donde se efectuó el ensayo, adicionalmente para medir el pH se tomó 20 g de suelo de cada caja, se vertió en un recipiente con agua destilada. Esto se realizó cada dos días durante un periodo de tiempo de 30 días. (Anexo A9).

4.2.6. Análisis del TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo)

Para poder determinar los TPH se tomó como guía referencial la metodología EPA (Agencia de Protección Ambiental) 3540C SOXHLET EXTRACTION que se utilizó para la extracción de los TPH de las muestras del suelo y el método EPA 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC/FID que se empleó para cuantificar la concentración de los TPH en el cromatógrafo de gases.

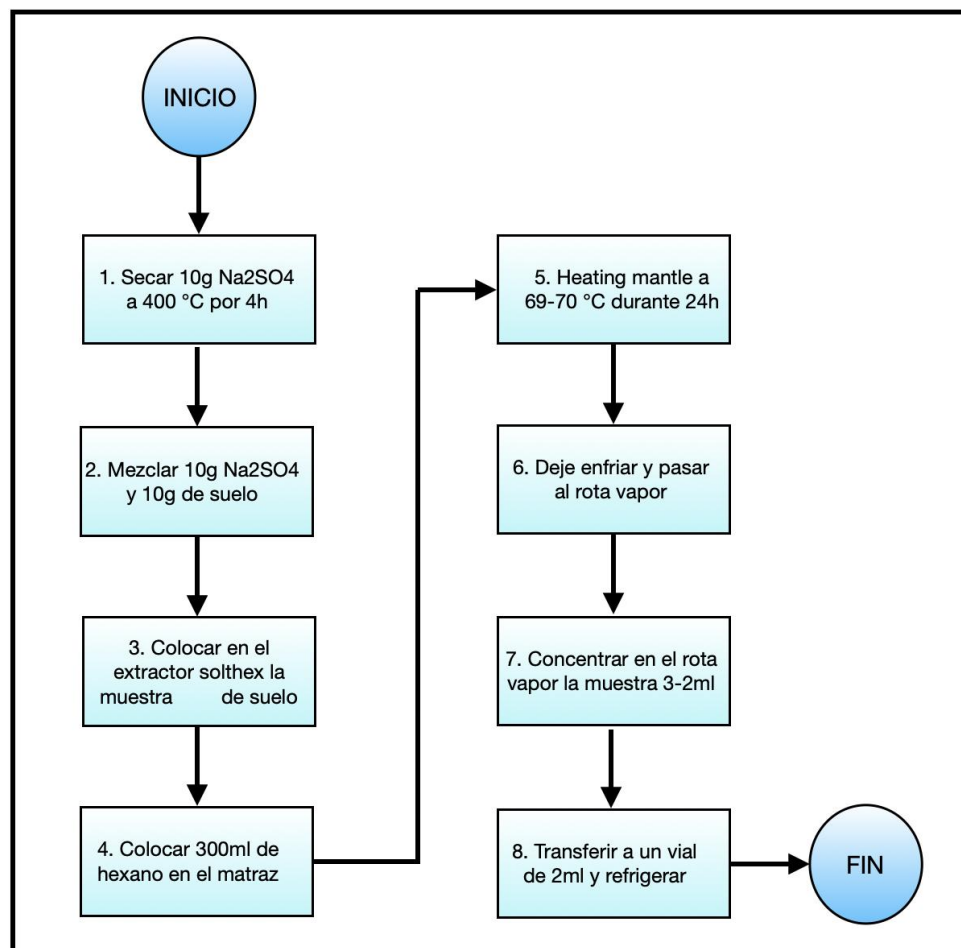
4.2.6.1.Extracción de TPH de las Muestras de Suelo.

El método 3540C SOXHLET EXTRACTION se aplicó para poder aislar y concentrar los TPH presentes en el suelo y que se encuentran en contacto con el disolvente de extracción (hexano) de las muestras de suelo. A continuación, se detalla el procedimiento (Anexo A10).

1. Pesar 10g de anhídrido sulfato de sodio y secar a 400 °C en la mufla por 4 horas.
2. Mezclar 10g de anhídrido sulfato de sodio seco con 10g de muestra de suelo y colocar en el papel filtro en forma de dedal.
3. El papel filtro en forma de dedal con la muestra se coloca en el extractor soxhlet.
4. Colocar aproximadamente 300ml de hexano en un matraz de 500ml.
5. Conectar el matraz al extractor soxhlet en una heating mantle (manta calefactora) a una temperatura de 69-70 °C que es el punto de ebullición del hexano durante 24 horas.
6. Dejar enfriar aproximadamente por 10 minutos y pasar al rota vapor con una temperatura de 70 °C aproximadamente para su posterior destilación.
7. Cuando la muestra alcance alrededor de 3-2ml en el rota vapor retirarla y dejar enfriar por 10 minutos.
8. Transferir en un vial de 2ml con tapa rosca revestido de PTFE la muestra con ayuda de una jeringa de 3ml y almacenar la muestra en refrigeración.

Figura 5

*Esquema del procedimiento de extracción de TPH basado en el método 3540C
SOXHLET EXTRACTION*



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

4.2.6.2. Análisis Cuantitativo de TPH de las Muestras de Suelo.

El método EPA 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC/FID se utilizó como guía para poder cuantificar la concentración de TPH de las muestras de suelo, el equipo que se emplea es un cromatógrafo de gases CG-AGELENT 6890 del laboratorio CTASCAL (Centro de Tecnología y Aseguramiento de Calidad Analítica).

Este equipo está provisto de un detector de ionización de flama (FID) con una columna capilar PONA (Crosslinked methyl silica gum); tiene las siguientes dimensiones $30\text{m} \times 320\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m}$ con la capacidad de soportar una temperatura máxima de $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la separación de los TPH.

Como primer paso se realizó una solución stock de 100mg/ml , en un matraz aforado de 50ml donde se pesó 5g aproximadamente de diésel en 50 ml de hexano (disolvente), a partir de la solución stock se preparó cinco niveles de concentraciones conocidas de: 2mg/ml , 5mg/ml , 10mg/ml , 25mg/ml y 50mg/ml . Se realizó la curva de calibración (Anexo A11) para poder extrapolar y obtener la concentración de TPH utilizando el área bajo la curva de los picos resultantes con la ayuda de la ecuación de la recta (ecuación 3) permitiendo estimar la concentración de los hidrocarburos totales de petróleo en mg/ml .

$$y = mx + b$$

Ecuación 3 Ecuación de la recta.

Donde: y = concentración de TPH en mg/ml ; m = pendiente de la recta; x = área bajo la curva de los picos detectados y b = punto en el cual la recta corta en el eje de las ordenadas.

Para la obtención de la concentración de los TPH en el suelo en mg/kg , se consideró el volumen del disolvente (hexano en litros) en el que fueron solubilizados los contaminantes y la cantidad de suelo empleada para la extracción; haciendo uso de estos datos se utilizó la ecuación 4.

$$\text{Concentración en muestra [mg/kg]} = \frac{\text{concentración extrapolada} \times \text{volumen del disolvente}}{\text{suelo empleado para la extracción}}$$

Ecuación 4 Determinación de la concentración de la muestra en mg/kg fuente: (Méndez , 2011).

Las condiciones de trabajo se desarrollaron de acuerdo a la metodología EPA 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC/FID que se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 6

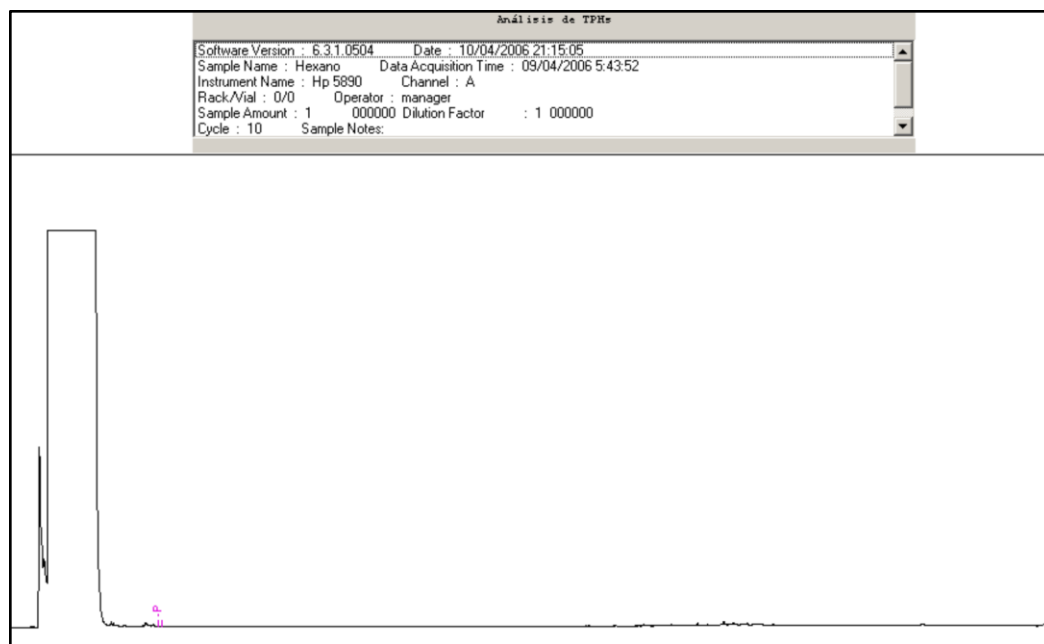
Condiciones ideales para el desarrollo cromatográfico

Temperatura del inyector	200 °C		
Temperatura del detector	340 °C		
Flujo total	33.4 ml/min	Split ratio	30:1
		Split flow	29.2 ml/min
Gas detector	H ₂ : Air: N ₂ (40:400:30 ml/min)		
Volumen de inyección	1µl		
Tiempo de corrida	34 min		
Programa de temperatura			
Temperatura inicial	45 °C durante 3 min		
Programa	45 °C hasta 275 °C con una velocidad de 12 °C/min		
Temperatura final	275 °C durante 12 min		

Con estas condiciones de trabajo se procedió a inyectar el hexano para la limpieza de la columna y de igual manera para validar que no exista ninguna interferencia de otros materiales presentes en la columna como se ve en la ilustración 6, luego de la validación se procedió a inyectar las muestras que se utilizaron para la elaboración de la curva de calibración y finalmente las muestras de estudio. El software utilizado para la lectura de los cromatogramas fue el programa TotalChrom Navigator-Hp5890 versión 6.3.1 (Anexo A11).

Figura 6

Cromatograma de Hexano



Nota: Tomado de (TotalChrom Navigator- Hp5890 versión 6.3.1).

4.2.7. Diseño Experimental

Previamente esterilizado y contaminado con diésel se probó el efecto de las concentraciones de TPH de 10000 ppm y 40000 ppm en tres tratamientos: A = tratamiento 1 (*Trichoderma* sp. + diésel), B = tratamiento 2 (*B. pumilus* + diésel) y C = tratamiento 3 (Sin microorganismos + diésel), con el objetivo de encontrar el mejor tratamiento de la reducción de TPH.

Las unidades experimentales se dispusieron en un diseño factorial 3×2 dividida en DCA (Diseño Completamente al Azar).

Tabla 7

Diseño experimental

DATOS	DETALLE
Diseño	Factorial 3×2 DCA
Unidades Experimentales	14
Concentraciones	2
Tratamientos	3
Repeticiones	3

Nota: Tabla de las características del diseño experimental. Fuente (*Los Autores, 2020*).

4.2.7.1. Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa estadístico Minitab (Software Estadístico) en el cual se realizó un ANOVA (Análisis de la varianza) en un arreglo factorial 3×2, además una prueba Tukey al 5% para evaluar el mejor de los tratamientos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del Suelo

Basados en la metodología como resultados de la textura, porcentaje de humedad y materia orgánica se obtuvo que el tipo de suelo que se utilizó en el presente trabajo experimental es de tipo arcilloso con un porcentaje de humedad del 14,11% y de materia orgánica del 5,69%.

5.2. Análisis Físico-Químico

Para los análisis físico-químicos se analizó la temperatura y el pH durante el periodo de tiempo de la investigación.

5.2.1. Temperatura

Tabla 8

Temperatura de cada tratamiento [°C]

Fecha	31/8/20	2/8/20	4/9/20	7/9/20	9/9/20	11/9/20	13/9/20	15/9/20	17/9/20	19/9/20	21/9/20	23/9/20	25/9/20	27/9/20	29/9/20
Concentración	Tratamiento														
10000 ppm	T1	18,5	17,6	19,5	19	18,3	19,7	19,8	17,9	18,7	19,6	19,8	19,1	18,1	18,5
	A11	18,6	17,7	19,6	19,3	18,3	19,2	19,5	17,6	18,2	19,2	19,4	18,8	17,9	18,2
	A12	18,5	17,5	19,4	19,2	18,2	19,3	19,5	17,4	18,4	19,2	19,5	19	17,7	18
	A13	18,7	17,6	19,5	19,3	18,1	19,4	19,3	17,3	18,3	19,3	19,4	18,9	17,9	17,9
	B11	18,6	17,5	19,6	18,4	18,5	19,3	19,3	17,4	18,4	19,2	19,4	18,8	18	18,2
	B12	18,7	17,7	19,6	18,5	18,5	19,3	18,6	17,9	18,5	19,3	19,5	18,8	18,1	18,2
	B13	18,5	17,6	19,5	18,5	18,4	19,4	18,6	17,8	18,6	19,6	19,7	19	18,2	18,2
Promedio total	18,65														
40000 ppm	T2	18,6	17,5	19,4	19	18,1	19,4	18,3	18	18,5	19,7	19,5	18,7	18,4	17,9
	A21	18,7	17,6	19,6	18,7	18,1	19,4	18,4	17,9	18,6	19,9	19,3	18,6	18	18,3
	A22	18,5	17,5	19,5	18,7	18,2	19,6	18,2	18,1	18,6	20,1	19,2	18,7	18	18,3
	A23	18,7	17,6	19,6	18,7	18,3	19,6	18,6	18,3	18,9	20,1	19,1	18,7	18,1	18,5
	B21	18,5	17,6	19,4	19,2	18,2	19,7	18,5	18,1	18,9	19,8	19,2	18,8	17,8	18,5
	B22	18,6	17,7	19,5	18,8	18,1	19,7	18,7	18,1	18,8	20,2	19,3	18,8	18,1	18,3
	B23	18,5	17,6	19,5	18,9	18,1	19,8	18,9	18,2	18,9	20,2	19,3	18,9	18,2	18,6
Promedio total	18,70														

Nota: Temperatura en [°C] durante el periodo de tiempo del ensayo. Fuente (Los Autores, 2020).

Como se observa en la tabla 8 la temperatura durante los 30 días se mantuvo a 18.65 °C ± 0.68 para los tratamientos de concentración de 10000 ppm y de 18,70 °C ± 0.65 para los tratamientos de 40000 ppm.

Las temperaturas promedio de cada tratamiento no son las adecuadas como menciona Ponce (2014), generalmente las condiciones para microorganismos mesófilos se encuentran entre 20 y 30°C al no estar en este rango establecido la biodegradación se da mas lenta.

La biodegradación se ve afectada debido a la disminución de la velocidad de reacción y con esto se ve alterado la actividad microbiana, al no estar en el rango óptimo de temperaturas (20°C – 30°C) como menciona Ponce (2014), pero si se encuentra en el rango de preferencia (15°C – 30 °C) de acuerdo a Wayens (2004).

La actividad microbiana también influye relativamente en el proceso de biodegradación, esto se debe a que la temperatura promedio del ensayo se encuentra entre 18,65 °C y 18,70 °C se habla de una temperatura baja y esto produce una pérdida de actividad microbiana disminuyendo el tiempo de la biodegradación, como menciona Ramos y Zuñiga (2008) demuestra que al incrementar la temperatura, la actividad microbiana sube considerablemente y esto ayuda a la biodegradación.

5.2.2. pH

Tabla 9

pH de cada tratamiento

	Fecha	31/8/20	2/8/20	4/9/20	7/9/20	9/9/20	11/9/20	13/9/20	15/9/20	17/9/20	19/9/20	21/9/20	23/9/20	25/9/20	27/9/20	29/9/20
Concentración	Tratamientos															
10000 ppm	T1	6,81	6,2	6,02	5,57	5,85	6,2	6,32	6,1	6,3	6,23	6,16	5,94	6	6,03	6,04
	A11	6,79	6	6	6,24	6,05	6,4	6,25	6,2	6,4	6,53	6,51	6,25	6,3	6,41	6,21
	A12	6,8	6,01	5,8	6,23	6,1	6,7	6,18	6,1	6,5	6,15	6,4	6,24	6,3	6,14	6,21
	A13	6,82	6,02	5,9	6,23	6,02	6,6	6,58	6,1	6,4	6,33	6,5	6,1	6,2	6,14	6,35
	B11	6,79	6,02	6,08	5,97	5,66	6,3	6,17	5,9	6,3	6,27	6,32	6,13	6,1	6,17	6,11
	B12	6,82	6,02	6,02	5,92	5,81	6,3	5,96	5,9	6,4	6,4	6,52	6,08	6,1	6,26	6,17
	B13	6,81	6,01	6	6,03	5,74	6,5	5,95	6,1	6,3	6,38	6,57	6,33	6,1	6,25	6,23
Promedio total	6,22															
40000 ppm	T2	6,53	6,15	5,8	5,67	6,26	6,44	6,05	6,2	6,04	6,4	6,4	6,3	6,1	6,1	6,27
	A21	6,52	6,1	5,85	6,03	6,27	6,71	6,27	6,5	6,51	6,5	6,6	6,32	6,1	6	6,35
	A22	6,51	6,11	5,9	6,26	6,4	6,61	6,22	6,3	6,36	6,5	6,5	6,32	6,1	6	6,27
	A23	6,5	6,1	5,92	6,27	6,27	6,52	6,17	6,3	6,2	6,4	6,3	6,28	6,1	6,1	6,39
	B21	6,53	6,1	5,7	5,56	5,77	6,25	6,09	6,2	6,35	6,4	6,3	6,57	6,2	6	6,45
	B22	6,51	6,11	5,68	5,5	5,83	6,13	5,93	6,4	6,22	6,4	6,4	6,26	6,1	6,1	6,33
	B23	6,52	6,1	5,68	5,38	5,91	6,2	6,09	6,3	6,4	6,4	6,3	6,15	6	6,1	6,32
Promedio total	6,21															

Nota: pH medido durante el periodo de tiempo que duro el ensayo. Fuente (Los Autores, 2020).

Como se detalla en la tabla 9 el pH no tiene valores significativos, ya que no dispone de cambios imprevistos que lleve a desarrollar un análisis estadístico.

La poca variación de pH en algunas semanas se debe a la liberación de los compuestos del hidrocarburo (Diésel) en el suelo, cambiando sus propiedades y permitiendo que los microorganismos tanto de *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus* empiecen a degradar y de igual forma comiencen acoplarse al sitio.

Por otra parte, Según Hernandez, San Martin y Hernandez (2019) menciona que el pH promedio para un trabajo de metabolismo del *Bacillus pumilus* varía entre 5 a 6 y lo que señala Singh y otros (2014), el pH promedio para un trabajo de metabolismo del *Trichoderma* sp. varía entre 6,6 a 6,8.

Según Britton (1984) menciona que el pH del suelo varía por la acidificación del proceso de degradación de los derivados de los compuestos del hidrocarburo. También menciona Muñoz (2016) que se pudo dar por la libertad de los compuestos hidrocarburíferos del suelo utilizado y la carga microbiana por la cual se realizó el ensayo. Dibble y Bartha (1976) mencionan que el pH óptimo establecido para el proceso de biodegradación es (pH 6 a 7), Los dos microorganismos tanto *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus* se encuentran en el rango de pH adecuado respectivamente con esto podemos verificar que los tratamientos se encuentran en los rangos permitidos para una degradación en el suelo por el hidrocarburo según Borguer (1976).

5.3. Análisis Cuantitativo de TPH en las Muestras de Suelo

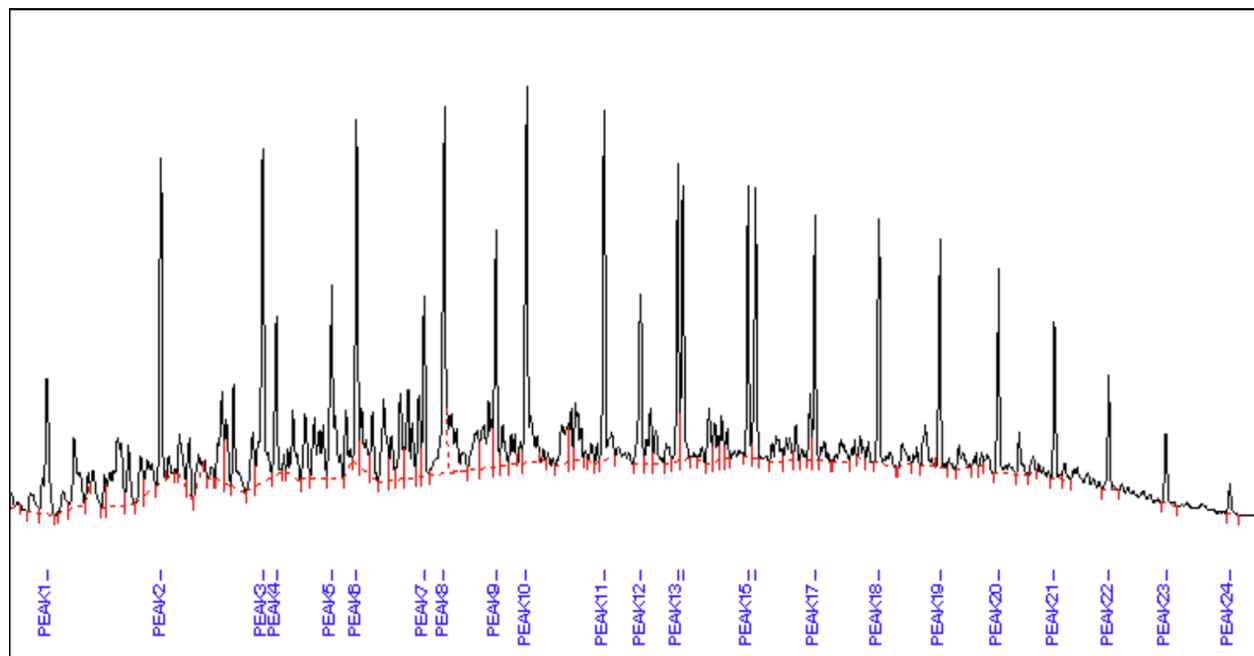
5.3.1. Identificación de Picos

Para poder determinar la concentración de TPH se inyectó los estándares, donde se identificaron claramente 24 picos en el cromatograma en el cual la suma de las áreas bajo la curva

de estos 24 picos es la concentración de TPH como se aprecia en la ilustración 7, también se utilizó para la determinación de los tiempos de retención como se observa en la tabla 10.

Figura 7

Cromatograma del estándar de diésel de 25mg/ml



Nota: El presente cromatograma se puede observar los 24 picos representativos de TPH, donde la suma de las áreas bajo la curva de estos picos da como resultado la concentración de TPH en mg/ml. Fuente (*Los Autores, 2020*).

Tabla 10

Tiempos de retención de los 24 picos de los TPH de los estándares del método desarrollado

Pico	Tiempos de retención [min]	Áreas [$\mu V*s$]	Pico	Tiempos de retención [min]	Áreas [$\mu V*s$]
1	9,164	320683,33	13	17,029	388989,24
2	10,582	438009,14	14	17,089	383097,12
3	11,855	604398,58	15	17,901	340183,28
4	12,023	213326,14	16	17,996	360084,08
5	12,714	447661,05	17	18,735	307933,97
6	13,025	445531,68	18	19,531	343538,54
7	13,867	238155,72	19	20,292	266496,02
8	14,116	636466,75	20	21,022	280233,05
9	14,759	329340,04	21	21,719	190244,08
10	15,141	655153,85	22	22,394	151897,28
11	16,108	492492,95	23	23,111	103892,59
12	16,563	292728,29	24	23,907	45956,61

Nota: Tabla de los tiempos de retención de los 24 picos obtenidos en los cromatogramas de los estándares y las áreas de bajo la curva. Fuente (*Los Autores, 2020*).

5.3.2. Resultados Obtenidos de la Cuantificación de los TPH Utilizando el Cromatógrafo de Gases.

Para poder cuantificar los TPH se elaboró la curva de calibración como primer paso en la cual se utilizó los cinco estándares de concentraciones conocidas de 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml y 50mg/ml, a partir de los datos de la tabla 11 donde se muestra en el eje de las abscisas la concentración de los estándares y en el eje de las ordenadas la suma de las áreas de los 24 picos de cada estándar que se obtuvieron, los reportes cromatográficos de los estándares están en el Anexo B1.

Como resultado de la curva de calibración se obtuvo un R^2 de 0,9995 una pendiente de 324123 y un valor b de 50888 como se puede ver en la ilustración 8.

Tabla 11

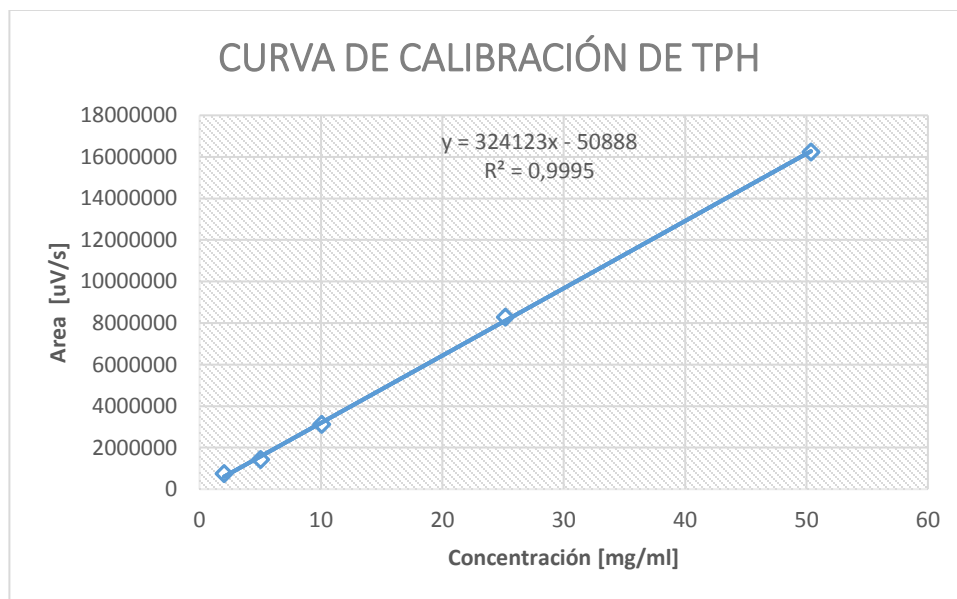
Correspondencia lineal entre la concentración y el área

Curva de Calibración		
Nº	Eje de las "X" Concentración en [mg/ml]	Eje de las "Y" [uV/s]
1	2,01456	750350,03
2	5,0364	1421497,23
3	10,0728	3112713,44
4	25,182	8276493,37
5	50,364	16220890,01

Nota: Tabla de correspondencia lineal entre la concentración y la suma del área los 24 picos de cada concentración. Fuente (Los Autores, 2020).

Figura 8

Curva de calibración para la determinación de la concentración de TPH



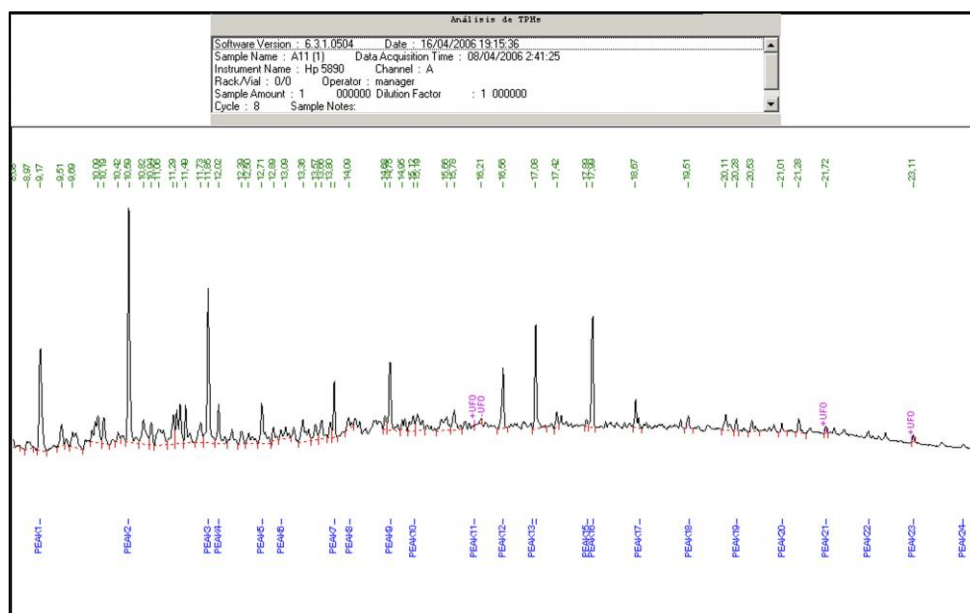
Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

El coeficiente de correlación de la curva de calibración para este ensayo fue de 0.9995 y debe ser mayor a 0.999 según Romero (2010), esto comprueba que el ajuste a la función lineal es apropiado para la relación absorbancia-concentración.

Una vez que se obtuvo la curva de calibración se realizó la determinación de TPH de los diferentes tratamientos, en las siguientes ilustraciones se puede apreciar algunos cromatogramas.

Figura 9

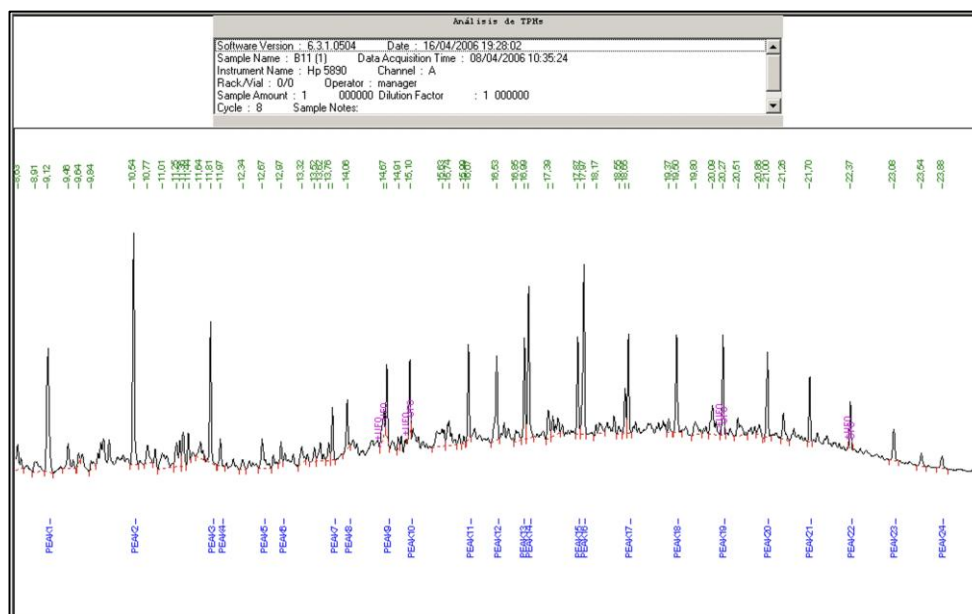
Cromatograma de la muestra A11 (1) del tratamiento de 10000 ppm con Trichoderma sp.



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

Figura 10

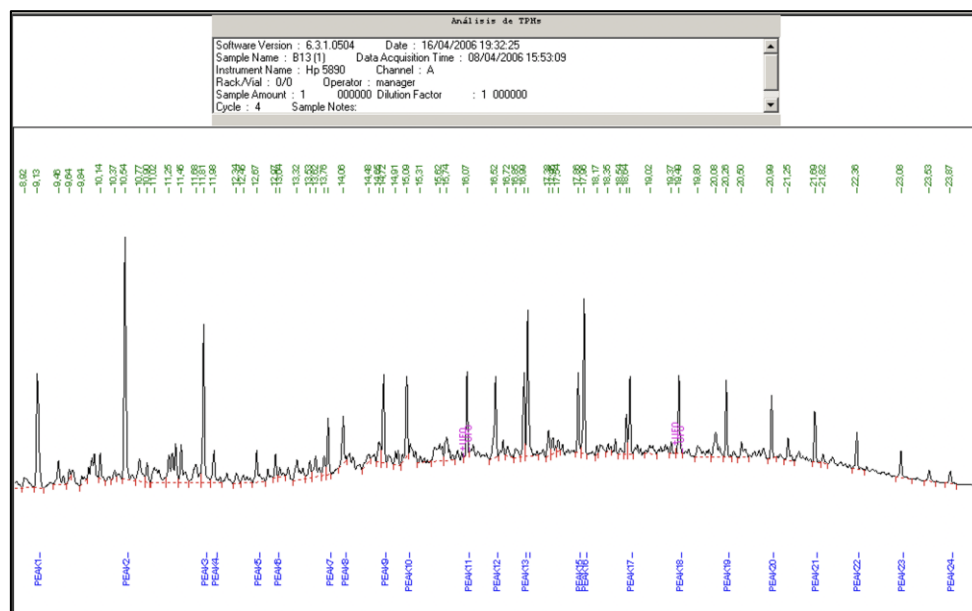
Cromatograma de la muestra B11 (1) del tratamiento de 10000 ppm con B. pumilus



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

Figura 11

Cromatograma de la muestra B13 (1) del tratamiento de 10000 ppm con B. pumilus



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

Como se observa en las tablas 12 y 13 se determinó las concentraciones de TPH para cada uno de los tratamientos y concentraciones, en los que se utilizó la ecuación 3 que hace referencia a la curva de calibración para la extrapolación de la concentración de las muestras en mg/ml y la ecuación 4 para la concentración de la muestra en mg/kg, algunos reportes cromatográficos de los tratamientos, testigos y concentraciones iniciales están en el Anexo B2.

Tabla 12

Muestras con tratamiento de concentración de 10000 ppm

Nº	Muestra	Área Y [uV/s]	Concentración extrapolada [mg/ml]	Concentración en muestra [mg/kg]	Promedio [mg/kg]
1	Ci 10000 (1)	4533779,41	14,14	9194,14	9464,16
2	Ci 10000 (2)	7086486,17	22,02	9909,26	
3	Ci 10000 (3)	5423292	16,89	9289,06	
4	T1 (1)	3984609,51	12,45	9960,41	9460,83
5	T1 (2)	5909946,95	18,39	9195,33	
6	T1 (3)	4933447,84	15,38	9226,75	
7	A11 (1)	2040260,24	6,45	3225,86	2936,26
8	A11 (2)	1923174,76	6,09	3045,24	
9	A11 (3)	1594166,7	5,08	2537,70	
10	A12 (1)	2639599,82	8,30	4150,41	3040,36
11	A12 (2)	2293628,12	7,23	3616,71	
12	A12 (3)	826817,83	2,71	1353,97	
13	A13 (1)	2681529,05	8,43	4215,09	3917,60
14	A13 (2)	3164071,62	9,92	4959,47	
15	A13 (3)	1620431,77	5,16	2578,22	
16	B11 (1)	4530332,44	14,13	4240,26	4116,16
17	B11 (2)	6264872,38	19,49	3897,14	
18	B11 (3)	2678919,52	8,42	4211,07	
19	B12 (1)	10102777	31,33	6265,32	4530,62
20	B12 (2)	3326334,4	10,42	4167,83	
21	B12 (3)	1996745,07	6,32	3158,73	
22	B13 (1)	3261814,77	10,22	5110,26	5355,83
23	B13 (2)	4323386,09	13,50	6747,86	
24	B13 (3)	2677824,56	8,42	4209,38	

Nota: Tabla de las muestras con tratamiento de concentración de 10000 ppm donde se determina la concentración de cada muestra en mg/kg y el promedio de cada repetición. Fuente (Los Autores, 2020).

Tabla 13*Muestras con tratamiento de concentración de 40000 ppm*

Nº	Muestra	Área Y [uV/s] Factor de Dilución 5	Área Y [uV/s]	Concentración extrapolada [mg/ml]	Concentración en muestra [mg/kg]	Promedio [mg/kg]
1	Ci 40000 (1)	8654979,93	43274899,7	133,67	40101,25	39693,41
2	Ci 40000 (2)	12987138,02	64935690,1	200,50	40099,95	
3	Ci 40000 (3)	12591411,79	62957059	194,40	38879,03	
4	T2 (1)	12917795,29	64588976,5	199,43	39886,01	39445,93
5	T2 (2)	11789142,84	58945714,2	182,02	40044,22	
6	T2 (3)	16588192,58	82940962,9	256,05	38407,57	
7	A21 (1)	11925688,67	59628443,4	184,13	36825,11	28125,74
8	A21 (2)	4273824,23	21369121,2	66,09	13217,21	
9	A21 (3)	11118547,58	55592737,9	171,67	34334,88	
10	A22 (1)	10803850,79	54019254	166,82	33363,96	31027,60
11	A22 (2)	6755145,87	33775729,4	104,36	20872,70	
12	A22 (3)	12580749,35	62903746,8	194,23	38846,14	
13	A23 (1)	11854433,15	59272165,8	183,03	36605,27	37737,57
14	A23 (2)	12549886,15	62749430,8	193,75	38750,92	
15	A23 (3)	12259994,28	61299971,4	189,28	37856,53	
16	B21 (1)	7765488,05	38827440,3	119,95	35984,79	32078,92
17	B21 (2)	6016859,97	30084299,9	92,97	27892,36	
18	B21 (3)	10478311,91	52391559,6	161,80	32359,60	
19	B22 (1)	12460408,34	62302041,7	192,37	38474,86	32260,84
20	B22 (2)	3157217,86	15786089,3	48,86	19544,40	
21	B22 (3)	12553886,34	62769431,7	193,82	38763,26	
22	B23 (1)	8416925,78	42084628,9	130,00	25999,71	32502,27
23	B23 (2)	11228674,99	56143375	173,37	34674,65	
24	B23 (3)	11928069,37	59640346,9	184,16	36832,46	

Nota: Tabla de las muestras con tratamiento de concentración de 40000 ppm donde se determina la concentración de cada muestra en mg/kg y el promedio de cada repetición, además estas muestras para una mejor lectura con el cromatógrafo de gases se procedieron a hacer unas disoluciones con un factor de dilución de 5. Fuente (*Los Autores, 2020*).

De las tablas 12 y 13 correspondientes a los resultados de las concentraciones, tanto de 10000 ppm y 40000 ppm respectivamente, se establece que: Según Ministerio de Hidrocarburos (2010) determina límites permisibles tanto de uso agrícola < 2500 mg/kg, industrial < 4000 mg/kg y ecosistemas sensibles < 1000 mg/kg, que ocupó el límite de uso industrial ya que las concentraciones se mantienen bajo los 4000 mg/kg. En la tabla 12 el *B. pumilus* no se entra en el límite y gracias a esto podemos señalar que la técnica de biodegradación puede tener un gran aporte en la degradación de TPH.

5.4. Análisis Estadístico

Se realizó un ANOVA (Análisis de la varianza) en un arreglo factorial 3x2 dividida en DCA, obteniendo como resultado las siguientes tablas.

Tabla 14

Coefficiente de variación

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% REMOCIÓN	18	0.96	0.94	24.32

Se obtuvo un coeficiente de variación de un 24,32% es decir que el 75,68% de los resultados depende de los tratamientos y el resto depende del efecto del ambiente o del azar.

Tabla 15

Cuadro de Análisis de la Varianza

Fuente	GL	SC Adj.	MC Adj.	Valor-F	Valor-P
CONCENTRACIÓN	1	3084,0	3084,00	79,99	0,0001
MICROORGANISMOS	2	6014,5	3007,23	78,00	0,0001
CONCENTRACIÓN*MICROORGANISMOS	2	1698,7	849,33	22,03	0,0001
Error	12	462,7	38,56		
Total	17	11259,8			

Observando la tabla número 15 de análisis de la varianza se determina que existe alta significancia estadística entre los factores de concentraciones y microorganismos además se obtuvo un p-valor de 0,0001 que es menor que 0,05 de significancia, se puede afirmar que la interacción entre la concentración y los microorganismos afecta de forma diferenciada el porcentaje de remoción de TPH.

Estos resultados según Hadibarata, Tachibana, y Itoh (2007) evidencia que el *Trichoderma* sp reduce las concentraciones de hidrocarburos en más de un 46% y según Romero, Salvioli, Cazau, y Arambarri (2002) disminuyo hasta un 84% de diesel por *Trichoderma* sp, mientras que Hernandez (2019) menciona que el *Bacillus pumilus* puede llegar a una biodegradación de un 51% ya que se evidencia en la versatilidad y adaptabilidad en hidrocarburos de petróleo en condiciones extremas. Esto determina una diferencia en cuanto a las concentraciones que se realiza y los microorganismos que se dispone en cada tratamiento del ensayo.

Tabla 16

*Agrupación de información mediante el método Tukey con un 95% de confianza .
Comparación de tratamientos*

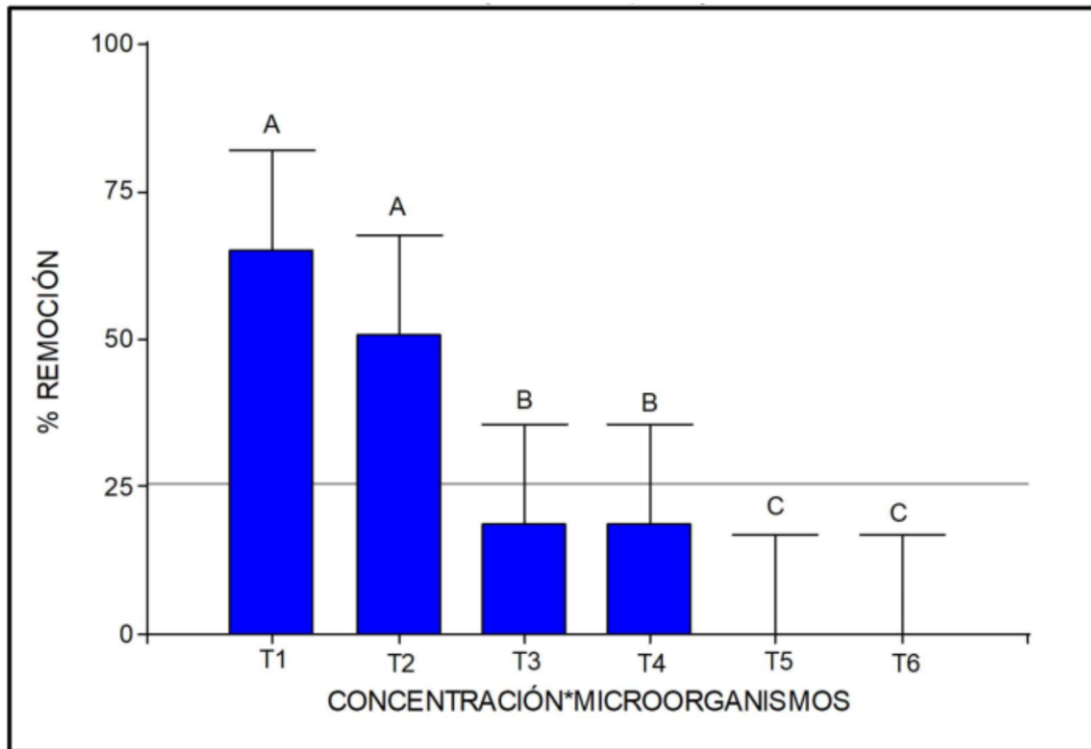
CONCENTRACIÓN*MICROORGANISMOS	N	Media	Grupos
10000 Trichoderma (T1)	3	65,15	A
10000 Bacillus pumilus (T2)	3	50,68	A
40000 Bacillus pumilus (T3)	3	18,67	B
40000 Trichoderma (T4)	3	18,63	B
10000 Testigo (T5)	3	0,02	C
40000 Testigo (T6)	3	0,01	C

Al realizar una prueba de tukey con una significancia del 5% las combinaciones que proporcionan el mejor resultado para la remoción de TPH fueron: con *Trichoderma* sp y *Bacillus*

pumilus a una concentración de 10000 ppm, pero por ocupar el primer lugar es mejor con *Trichoderma* sp. como se puede observar en la ilustración 12.

Figura 12

Diagrama de barra de los porcentajes de remoción de TPH de los diferentes tratamientos



Nota: Fuente (Los Autores, 2020).

Al poder determinar el porcentaje de remoción se obtiene como resultado que el tratamiento de 10000 ppm con *Trichoderma* sp. tiene un porcentaje de remoción con un 65,15% y el *B. pumilus* con un porcentaje de 50,68% como se observa en la tabla 17, esto se debe que fue expuesto a una baja concentración de hidrocarburo (Diésel).

Según Argumendo, Alarcon, Ferrera y Peña (2009) el *Trichoderma* sp. demuestra ser eficaz para biodegradación ya que degradan compuestos saturados y aromáticos de hidrocarburos, también tiene una considerable degradación de hidrocarburos de más de 4 anillos.

Según Castro y Rivillas (2012) menciona que el *Trichoderma sp.* es un hongo con ciertas características de alta reproducción en diferentes ambientes, que elige el hidrocarburo como fuente de alimentación (carbono) para su crecimiento, esto gracias a su alta esporulación permite una reproducción rápida en suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo.

Tabla 17

Porcentaje de remoción de los tratamientos con concentración 10000 ppm

Muestra	Concentración ppm	Porcentaje de remoción
Ci 10000	10000	0,00%
Testigo 1	10000	0,04%
Trichoderma sp.		
A11	10000	68,97%
A12	10000	67,87%
A13	10000	58,61%
TOTAL	65,15%	
B. pumilus		
B11	10000	56,51%
B12	10000	52,13%
B13	10000	43,41%
TOTAL	50,68%	

Para los tratamientos con 40000 ppm se obtuvieron los siguientes resultados: el *B. pumilus* con un porcentaje de 18,87% y el *Trichoderma sp.* con un porcentaje de 18,63% como muestra la tabla 18, esto se debe a que el *B. pumilus* fue sometido a una alta concentración de hidrocarburo y gracias a esto se adhirió con gran facilidad al sitio, mientras que el *Trichoderma sp.* no permite una degradación con facilidad en concentraciones mayor de 10000 ppm ya que su reproducción es lenta.

Según Annweiller y otros (2000) determina que el género *Bacillus* tiene una gran importancia en la biodegradación de suelos contaminados con TPH, debido a la resistencia de

situaciones extremas y a la capacidad de generar esporas, también Brill (1980) menciona que el *B. pumilus* puede tolerar concentraciones altas de hidrocarburo en el sitio de crecimiento, ya que colocan como su fuente de alimentación el carbono y sus derivados como: el naftaleno, pireno y fenantreno.

Tabla 18

Porcentaje de remoción de los tratamientos con concentración 40000 ppm

Muestra	Concentración ppm	Porcentaje de remoción
Ci 10000	40000	0,00%
Testigo 1	40000	0,06%
Trichoderma sp		
A21	40000	29,14%
A22	40000	21,83%
A23	40000	4,93%
TOTAL	18,63%	
B. pumilus		
B21	40000	19,18%
B22	40000	18,72%
B23	40000	18,12%
TOTAL	18,67%	

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- Se comprobó que el tratamiento con mejor resultado de remoción de TPH es a una concentración de 10000 ppm de diésel y utilizando *Trichoderma* sp.
- Se evidenció que el sistema de biopila a escala de laboratorio es una alternativa de fácil construcción debido a la disponibilidad de acceso permite realizar mediciones discretas de pH y temperatura, así como la adición y manejabilidad del *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus*.
- Se determinó que en suelos contaminados a una concentración de 10000 y 40000 ppm de diésel utilizando tanto *Trichoderma* sp. y *Bacillus pumilus* presentó una biodegradación de TPH.
- Se evidenció que para una concentración de 10000 ppm los porcentajes de remoción fueron: con *Trichoderma* sp. del 65,15% y con *Bacillus pumilus* del 50,68%. En cambio, para una concentración de 40000 ppm, fueron: con *Trichoderma* sp. del 18,63% y con *Bacillus pumilus* del 18,67%.

6.2. Recomendaciones

- Se puede añadir nutrientes cada cierto tiempo con el propósito de un adecuado crecimiento de los microorganismos y así poder tener una remediación más eficaz, se debe tener una relación de: C: N: P: K 100:15:1:1.
- Cumplir con todos los términos que menciona la EPA3540C SOXHLET EXTRACTION, en la sección de concentración de viales a 2ml, con la finalidad de no tener fallos en la lectura de los cromatogramas.

- Para una investigación más compleja también se puede, determinar que carbón específicamente de la cadena de carbonos se alimenta cada microorganismo con uso de estándares.
- Para una investigación más completa, se puede incluir o añadir un ensayo de cinética microbiana con el fin de monitorear el crecimiento de microorganismos y cual se desarrolla con más rapidez.
- En base a los costos, se recomienda utilizar *Trichoderma* sp. porque los precio en el mercado son más accesibles en comparación del *Bacillus pumilus*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Capital Natural y Analisis CB. (02 de Diciembre de 2011). *EVOLUCIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN AMBIENTES CONTAMINADOS CON MATERIA ORGANICA*. Obtenido de <https://www.eoi.es/blogs/franciscojosemancebo/2011/12/02/evolucion-de-la-biorremediacion-en-ambientes-contaminados-con-materia-organica/>
- Eumed.net. (Junio de 2004). *LA ERA PETROLERA EN EL ECUADOR Y SU INCIDENCIA EN EL PRESUPUESTO GENERAL*. Obtenido de <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/lavm-petr.htm>
- Ministerio del Ambiente. (4 de Noviembre de 2015). *ANEXO 2 DEL LIBRO VI DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE*. Obtenido de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155129.pdf>
- Biorremediacion*. (28 de Mayo de 2012). Obtenido de <http://microbiologia3bn.blogspot.com/2012/05/ventajas-y-desventajas.html>
- BBC. (04 de Abril de 2015). *¿Cómo llegó el petróleo a dominar el mundo?* Recuperado el 03 de Diciembre de 2019, de https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/04/150331_iwonder_historia_petroleo_finde_dv
- Cando, M. (Septiembre de 2011). *DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS*.

Recuperado el 03 de Diciembre de 2019, de

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>

Method EPA 8015B. (Julio de 2002). *Characterization of C6 to C35 Petroleum hydrocarbons in environmental samples: Total petroleum hydrocarbons, Aliphatic Hydrocarbons, Aromatic Hydrocarbons, Aproximate Boiling Point/carbon number distribution.*

Servicios Analiticos Generales S.A.C. (27 de Marzo de 2019). *Analisis de la calidad del suelo.*
Obtenido de http://www.sagperu.com/tph_suelos.html

Gooch JW. (2011). *Bioremediation*. In. (N. Y. Springer, Editor) doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_13261

Alexander, M., Bloom, B., Hopwood, D., & Hull, R. (2000). Encyclopedia of Microbiology. En J. Lederberg (Ed.). New York: Academic Press. Recuperado el 10 de Agosto de 2020, de https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=fhC_nz8eHh0C&oi=fnd&pg=PP2&dq=Bioremediation.+Encyclopedia+of+Microbiology&ots=FQ_5W_7d_R&sig=seAmNxXYmu04S1f6Nt04vTydpAA#v=onepage&q&f=false

Harvey, P., Campanella, B., & Castro, P. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. & Pollut. Res* 9, 29–47.
doi:<https://doi.org/10.1007/BF02987315>

Azubuike, C., Chikere, C., & Okpokwasili, G. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol*, 32, 180. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>

Kumar , R., & Yadav, P. (2018). Novel and Cost-Effective Technologies for Hydrocarbon Bioremediation. En V. Kumar, M. Kumar, & R. Prasad (Edits.), *Microbial Action on*

Hydrocarbons (págs. 545-548). Singapore: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_22

Naval Facilities Engineering Service Center Port Hueneme, California. (17 de Junio de 1996).

BIOPILE DESIGN AND CONSTRUCTION MANUAL. Recuperado el 11 de Agosto de 2020, de <https://clu-in.org/download/techfocus/bio/Biopile-design-and-construction-1996-tm-2189.pdf>

Higa, T., & Parr, J. (1994). BENEFICIAL AND EFFECTIVE MICROORGANISMS for a SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENT. 14. Recuperado el 12 de Agosto de 2020, de International Nature Farming Research Center : https://www.researchgate.net/profile/Carla_Boga/publication/271640001_Microbes_to_clean_indoor_pollutants/links/5757da2508aef6cbe35fc541.pdf

Dellagnezze, B., Gomes , M., & de Oliveira , V. (2018). Microbes and Petroleum Bioremediation. En V. Kumar , M. Kumar , & R. Prasad (Edits.), *Microbial Action on Hydrocarbons* (págs. 104-105). Singapore: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_5

Mahmoud , G., & Bagy , M. (2018). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. En V. Kumar , M. Kumar, & R. Prasad (Edits.), *Microbial Action on Hydrocarbons* (págs. 305-306). Singapore: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_12

Borah , D. (2018). Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon: An Overview. En M. Kumar , & R. Prasad (Edits.), *Microbial Action on Hydrocarbons* (pág. 325). Singapore: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_13

- Patowary, K., Saikia, R. R., & Kalitam, M. C. (2014). Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. . *Ann Microbiol*, 65, pages225–234. doi:<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0854-7>
- Kim, J. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant-producing bacterium *Bacillus pumilus* IJ-1 from contaminated crude oil collected in Taean, Korea. *Korean Soc Appl Biol Chem* 57, 5–14. doi:<https://doi.org/10.1007/s13765-013-4236-9>
- Sardrood , B. P., Goltapeh , E. M., & Varma, A. (s.f.). An Introduction to Bioremediation. En E. Goltapeh , Y. Danesh, & A. Varma (Edits.), *Fungi as Bioremediators. Soil Biology* (Vol. 32, págs. 12-14). Berlin, Heidelberg: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-33811-3_1
- Andreolli, M., Lampis, S., & Brignoli, P. (2016). *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 is a fungal biocatalyst suitable for the remediation of soils contaminated with diesel fuel and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res* 23, 9134–9143. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6167-6>
- Tripathi, P., Singh, P. C., & Mishra, A. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Techn Environ Policy* 15, 541–550. doi:<https://doi.org/10.1007/s10098-012-0553-7>
- Romero, D. (2010). *Desarrollo y validacion de un metodo para la determinacion de hidrocarburos totales de petroleo (TPHs) mediante espectrofotometria de infrarrojo con transformadas de fourieren suelos fortificados*. Quito.
- Hall, C., Tharakan, P., Hallock, J., Cleveland, C., & Jefferson, M. (2003). *Hydrocarbons and the evolution of human culture*. New York: Nature Publishing Group.

- U.S. Department of Health and Human Services. (1999). *Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)*. Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Lopez, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutierrez, S., & Miranda, J. (2006). *Bioremediacion de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petroleo*. Bogota: ISSN-NOVA.
- TULSMA LIBRO VI ANEXO 2. (04 de Noviembre de 2015). *NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL DEL RECURSO SUELO Y CRITERIOS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS*. Recuperado el 03 de Diciembre de 2019, de LIBRO VI ANEXO 2: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Acuerdo-097.pdf>
- Ministerio de Hidrocarburos . (2010). *Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas*. Quito.
- Rodríguez, M. A., & A. A. (2015). *MATERIAL DIDÁCTICO AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN Prácticas de Edafología Métodos didácticos para análisis de suelos*. Universidad de La Rioja.
- A. O. (2015). *Estudio Comparativo del Uso del Diesel Entre Europa y Ecuador, Utilizado para Motores de Vehículos*. (U. I. Ecuador, Editor) Recuperado el 16 de Noviembre de 2020, de <https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/610/1/T-UIDE-0560.pdf>
- Martinez, A., Perez, E., Pinto, J., Gurrola, B., & Osorio, A. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *SciELO*, 27(3), 119, 23-31.

- Martínez, & Infante. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos*. (SciELO, Ed.) Recuperado el 18 de Noviembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001
- Chamberlain, & Chang. (26 de Abril de 2012). *Bacillus pumilus*. (M. S. University., Editor) Recuperado el 18 de Noviembre de 2020, de MicrobeWiki: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_pumilus
- Velasquez, J. (Junio de 2017). Contamination of soil and water by hydrocarbons in Colombia. Analysis of phytoremediation as a biotechnology strategy for recovery. *Revista de Investigacion Agraria y Ambiental*, 8(1), 21-28.
- Méndez , M. (2011). *Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar–Venezuela*. (N. 1. Revista Ciencia e Ingeniería. Vol. 32, Ed.) Recuperado el 14 de Diciembre de 2020, de Ciencia e Ingeniería: <https://www.redalyc.org/revista.oa?id=5075>
- Alcivar, A. (2020). Metodos para determinar granulometria de los suelos. *ResearchGate*, 4-5. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/343894015_METODOS_PARA_DETERMINAR_GRANULOMETRIA_DE_LOS_SUELOS
- Lanza, G., Minnick, G., Villegas, V., Irahola, J., Ramallo, J., & Calbimontes, G. (1999). *Educacion Ambiental para el tropico de cochabamba*. Cochabamba: Jatun Sacha. Obtenido de <http://www.fao.org/3/ah645s/AH645S04.htm>

- Mendez, E. (2016). Validacion del metodo analitico walkley y black de materia organica en suelos arcillosos, francos y arenosos del Ecuador. *Universidad Central del Ecuador*, 5-11.
- Gomez, M., & Vidal, S. (2007). Correlacion de determinacion de humedad de suelos por medio de secado en horno y en microondas. *Construccion*, 6(1), 28-34. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1276/127619409003.pdf>
- Ponce, D. (2014). Biorremediacion de suelos contaminados con hidrocarburos. *Universidad de Bio-Bio*, 40-47.
- Wayens, C. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. *Escuela de Biología*, 17-18.
- Hernandez, Y., San Martin, P., & Hernandez, R. (2019). Uso de *Bacillus coagulans* para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz. *Universidad Veracruzana*.
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of trichoderma species at varying pH, temperature and agitation. *Virology and Mycology*, 1-7.
- Britton, L. (1984). *Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons*. In: D Gibson. New York: Microbial degradation of organic compounds. Microbiology series.
- Dibble, J., & Bartha, R. (1976). Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environ. Microbiol*, 544-550.

- Verstraete, W., Vanloocke, R., & Borguer, R. (1976). Modeling of the breackdown and the molbilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. *Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp.*, 98-112.
- Argumendo, R., Alarcon, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El genero fungico Trichoderma y su relacion con contaminates organicos e inorganicos . *Int. contaminacion ambiental*, 258-264.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp. Modos de accion, eficacia y usos en el cultivo de cafe*. Chinchina-Caldas: Cenicafe.
- Annweiller, E., Richnow, H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., & Michaelis, W. (2000). Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile Bacillus thermoleovorans. . *Applied and Environmental Microbiology*, 518-523.
- Brill, W. (1980). Biochemical genetics of nitrogen fixation . *Microbiological Reviewa*, 449-467.
- Delgadillos, M. (Agosto de 2018). *COMPOSTAJE EN BIOPILAS PARA LA LIMPIEZA DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO*. Recuperado el Febrero de 2021, de Agro Productividad, 9(8): <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/797>
- Ramos, E., & Zuñiga, D. (2008). EFECTO DE LA HUMEDAD, TEMPERATURA Y PH DEL SUELO EN LA ACTIVIDAD MICROBIANA A NIVEL DE LABORATORIO. *Ecologia Aplicada*, 7(1, 2).

- Muñoz, S. (2016). Evaluación de la eficacia de trichoderma sp y pseudomona sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Hadibarata, T., Tachibana, S., & Itoh, K. (2007). Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol*.
- Romero, M., Salvioli, M., Cazau, M., & Arambarri, A. (2002). Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environ Pollut*, 159–163.
- Hernández, Y. (2019). Uso de Bacillus coagulans para la biorremediación de sedimentos contaminado por hidrocarburos en el ejido el sacrificio tuxpan. *Universidad Veracruzana*.
- Zamora, A., & Ramos, J. (Abril de 2012). *Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana*. Recuperado el 23 de Febrero de 2021, de scielo:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612012000100002
- Briseño, J. (2018). *Identificación molecular hidrocarbonoclastas nativas de suelo en sitios contaminados por petróleo crudo en Tabasco y Veracruz, Mexico*. Recuperado el 23 de Febrero de 2021, de
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/2208/Identificaci%C3%B3n%20molecular%20de%20cepas%20hidrocarbonoclastas%20nativas%20de%20suelo%20en%20sitios%20contaminados%20por%20petr%C3%B3leo%20crudo%20en%20Tabasco%20y%20Veracruz>.

8. ANEXOS

8.1. Anexos A Materiales y Metodología

8.1.1. Anexo A1 toma de Muestra



Toma y transporte de la muestra de suelo para el respectivo tratamiento del ensayo.

Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.2. Anexo A2 Tamizado de Muestra



Separación de todo residuo de la muestra de suelo por el tamiz de 4mm. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.3. Anexo A3 Textura



Determinación de textura de la muestra de suelo. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.4. Anexo A4 Porcentaje de Humedad y Materia Orgánica



Determinación de Porcentaje de peso húmedo y de materia orgánica. Elaborado por:

(Los Autores, 2020).

8.1.5. Anexo A5 Esterilización



Pesaje y Esterilización de las muestras de suelo en la autoclave. Elaborado por: (Los Autores,

2020).

8.1.6. Anexo A6 Desinfección y Adecuación



Desinfección y adecuación del sitio para la experimentación. Elaborado por: (Los Autores, 2020)

8.1.7. Anexo A7 Homogenización del Suelo



Homogenización del suelo y diésel con las cantidades correspondientes. Elaborado por:

(Los Autores, 2020).

8.1.8. Anexo A8 Inclusión de los Microorganismos



Inclusión de los microorganismos e inicio del ensayo. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.9. Anexo A9 pH y Temperatura



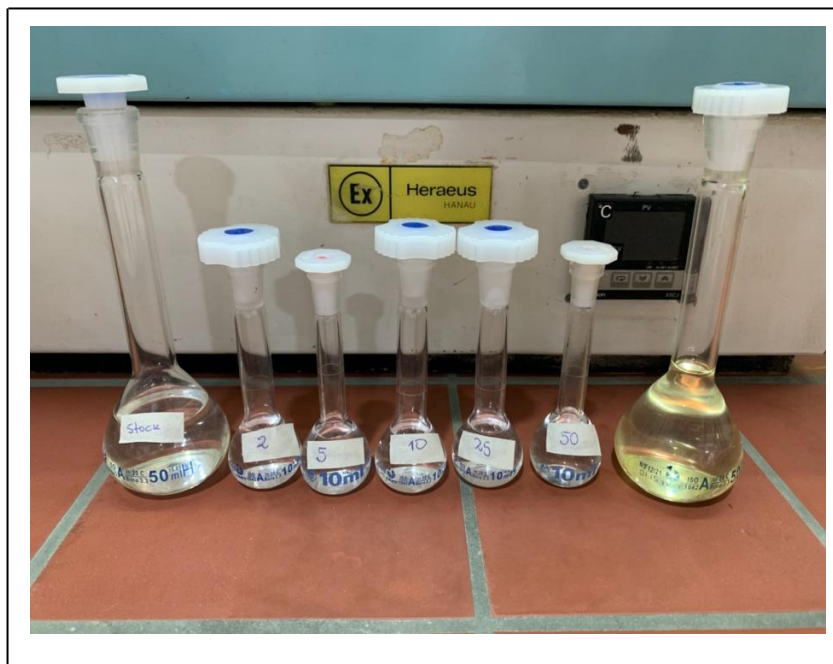
Análisis de parámetros de pH y temperatura en el sitio del ensayo. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.10. Anexo A10 Extracción de TPH en Muestras de Suelo

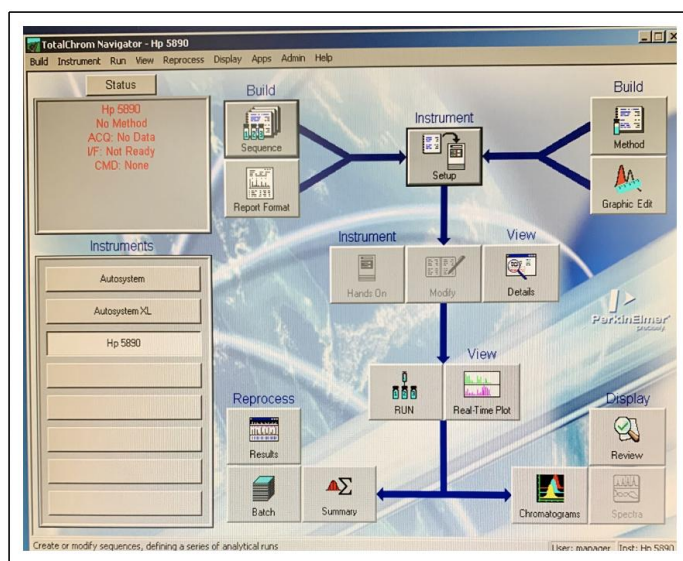


Extracción, destilación y colocación de la muestra del ensayo en viales para las lecturas en el cromatógrafo de gases. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.1.11. Anexo A11 Cuantificación de TPH



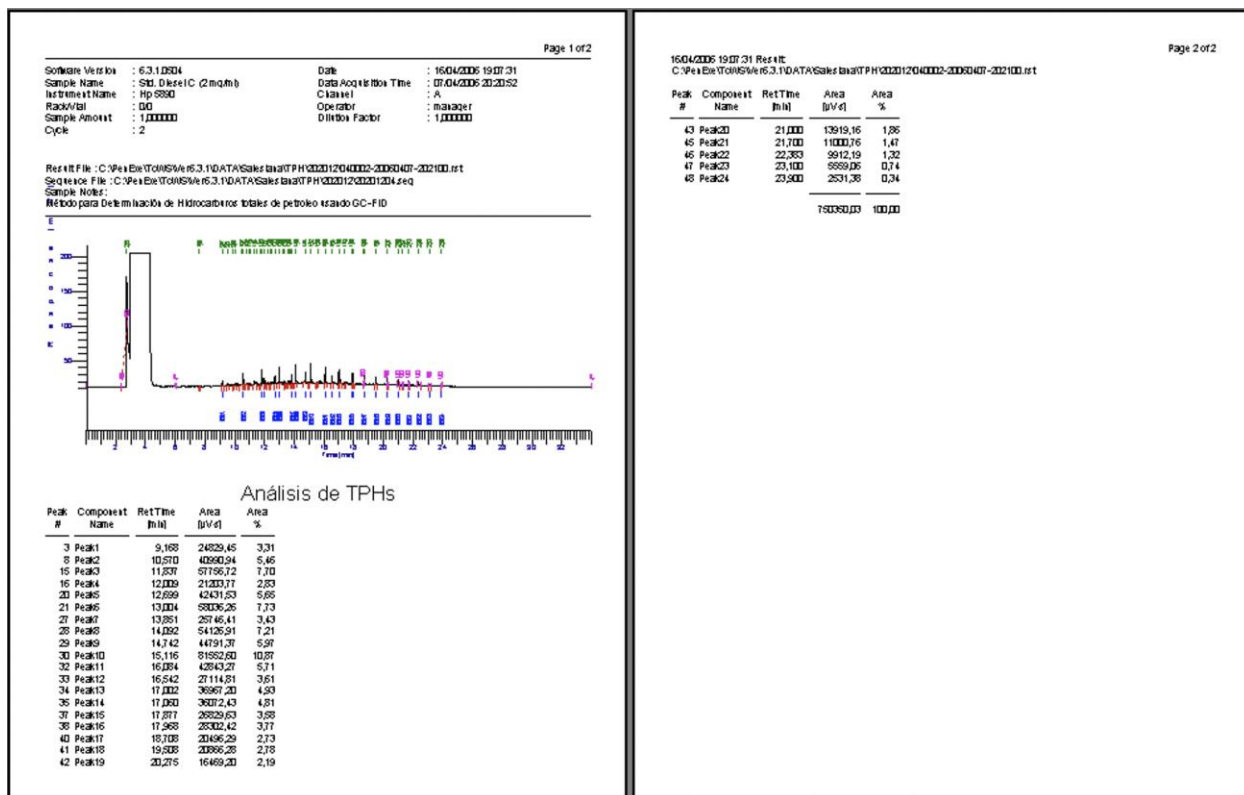
Solución stock y estándares de concentraciones de 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml y de 50mg/ml para la realización de la curva de calibración Elaborado por: (Los Autores, 2020).



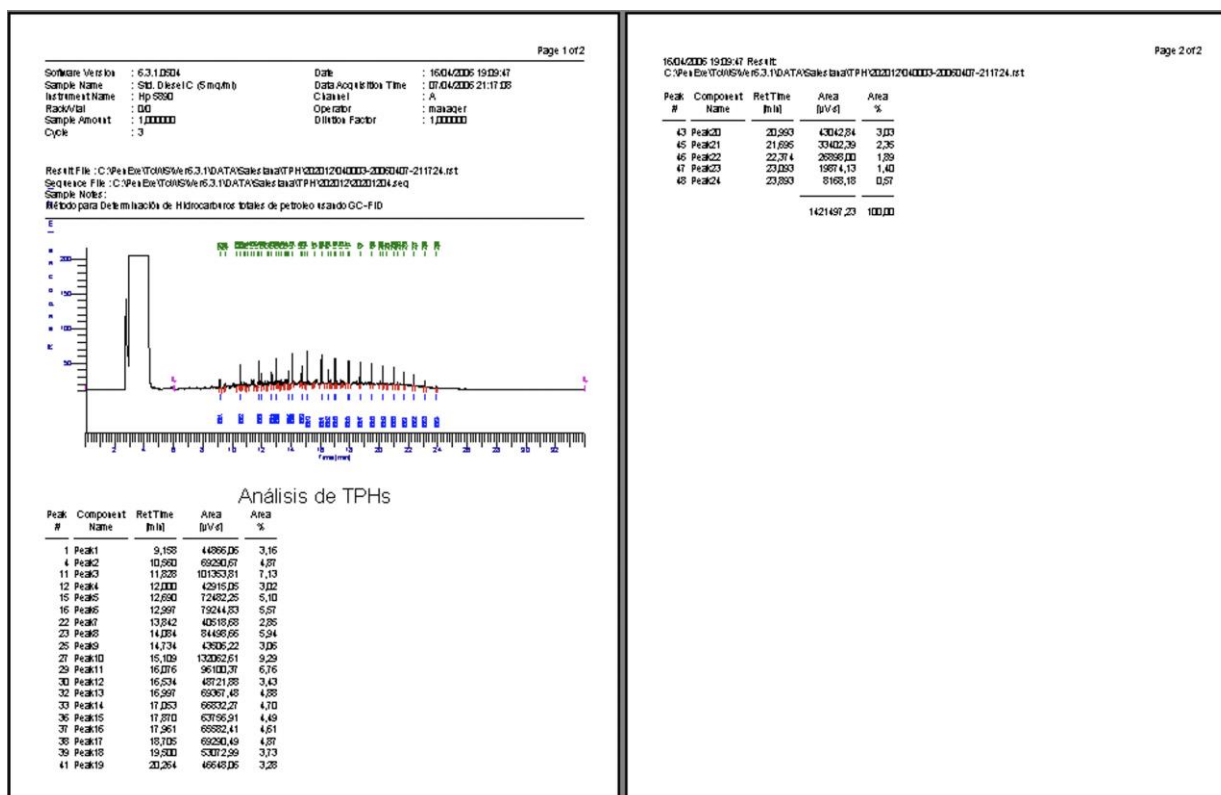
Software utilizado para la lectura y programación de las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases TotalChrom Navigator-Hp 5890 versión 6.3.1. Elaborado por: (Los Autores, 2020).

8.2. Anexos B Resultados

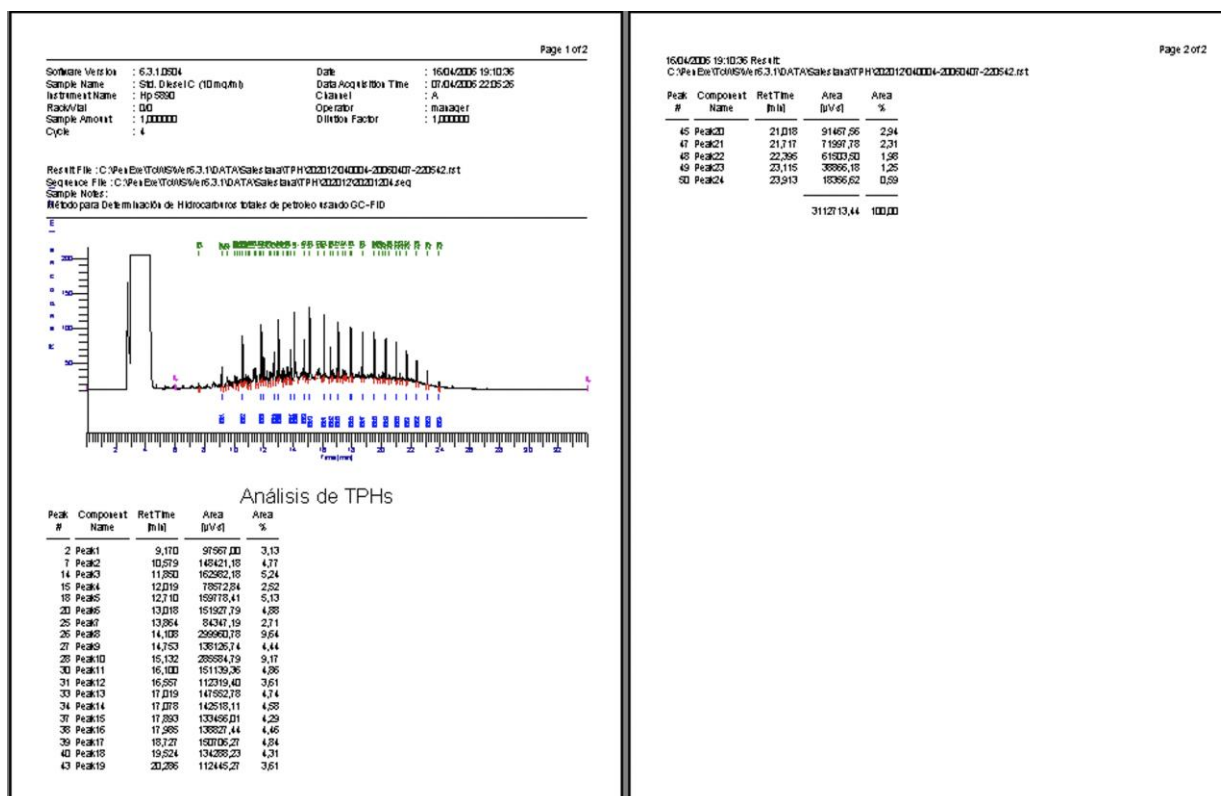
8.2.1. Anexo B1 Reportes Cromatográficos de Estándares



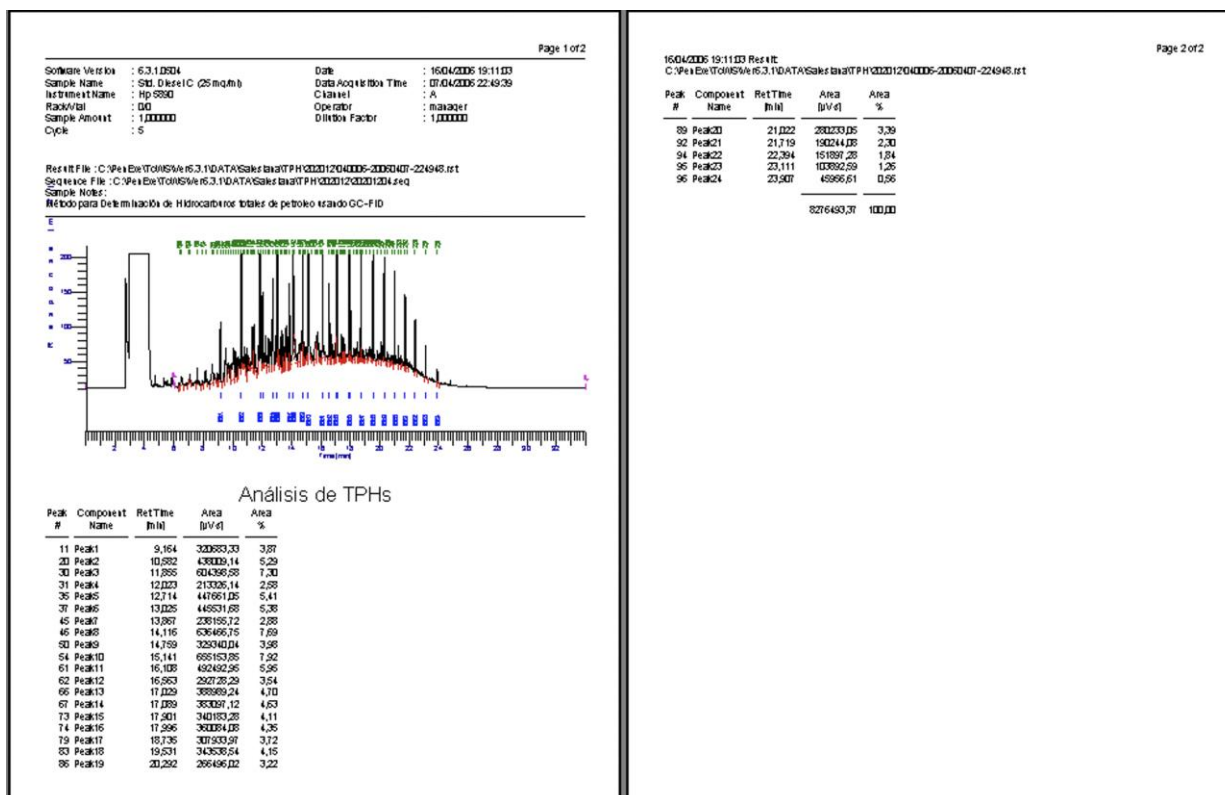
Reporte cromatográfico del estándar de 2mg/ml.



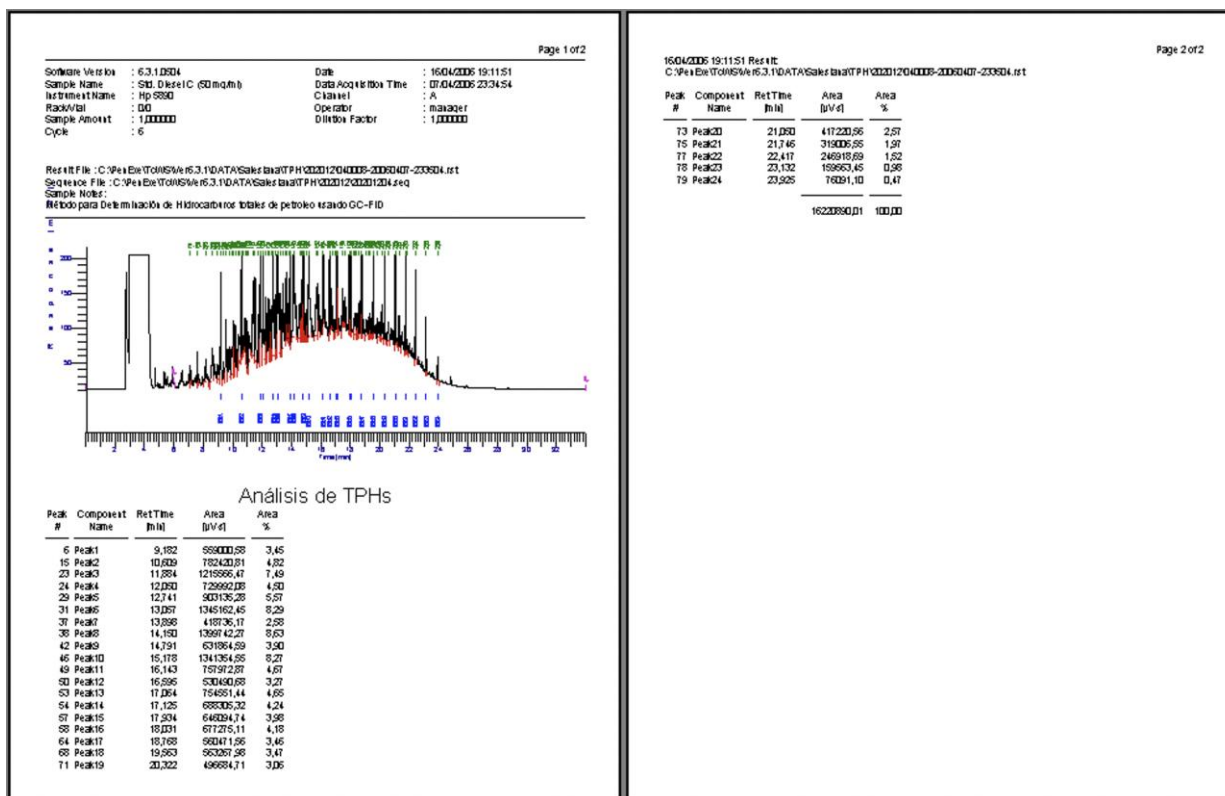
Reporte cromatográfico del estándar de 5mg/ml.



Reporte cromatográfico del estándar de 10mg/ml.

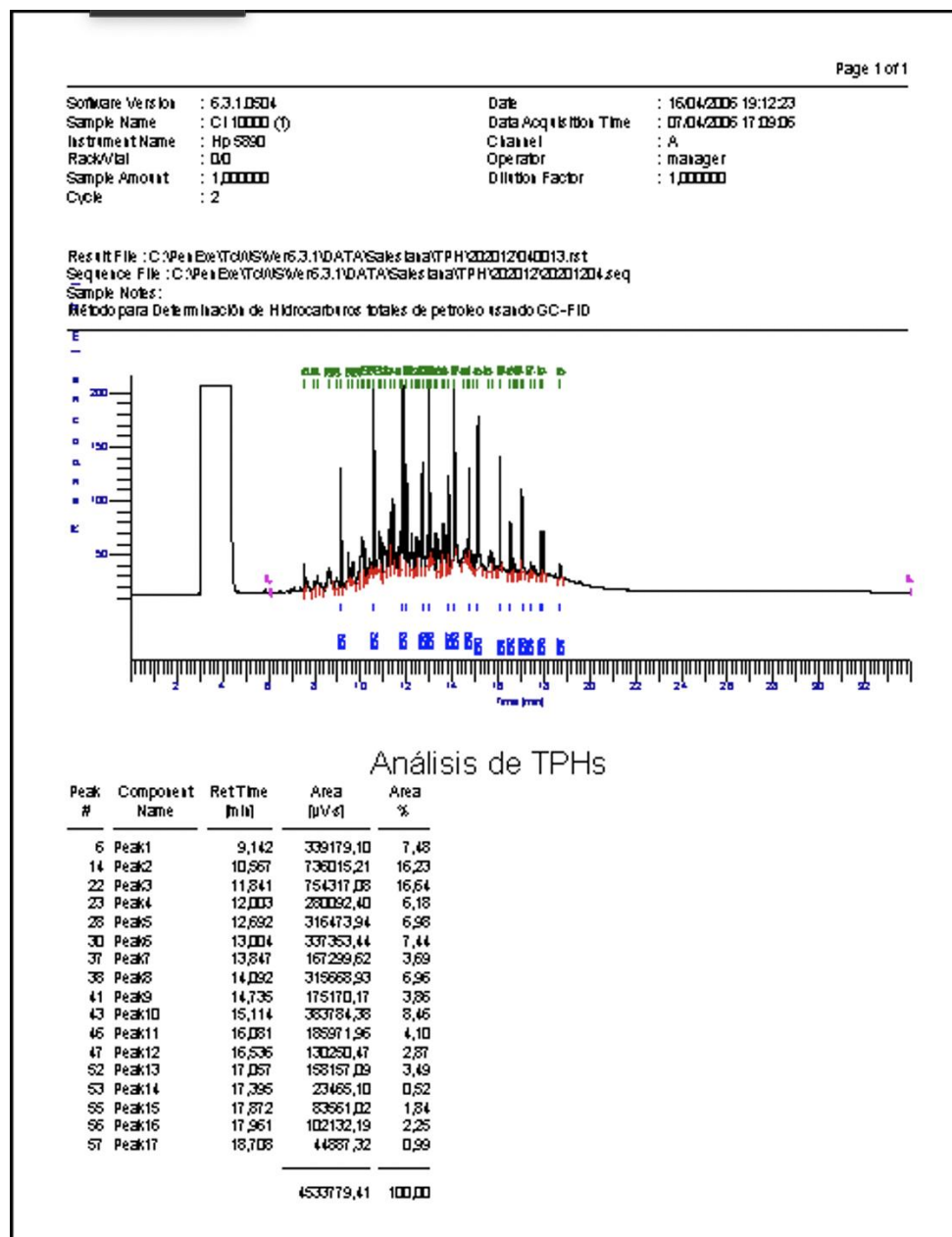


Reporte cromatográfico del estándar de 25mg/ml.

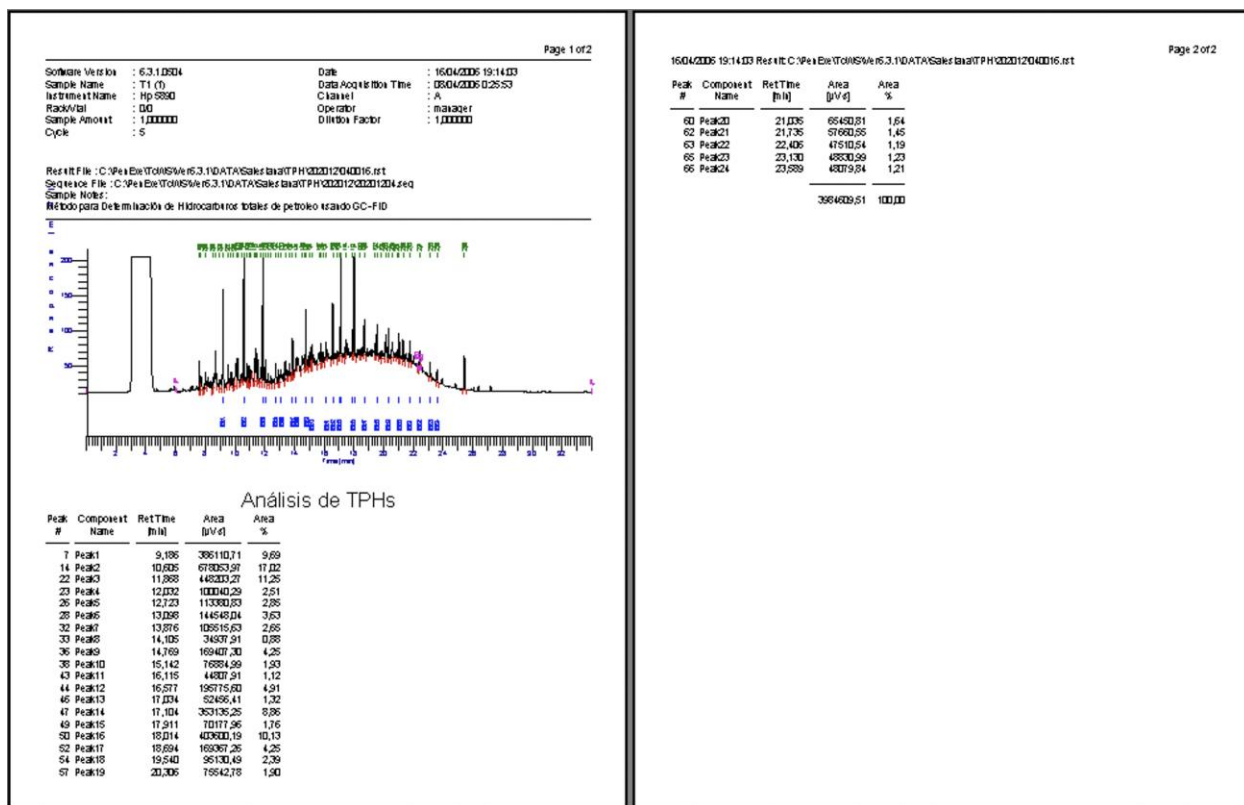


Reporte cromatográfico del estándar de 50mg/ml.

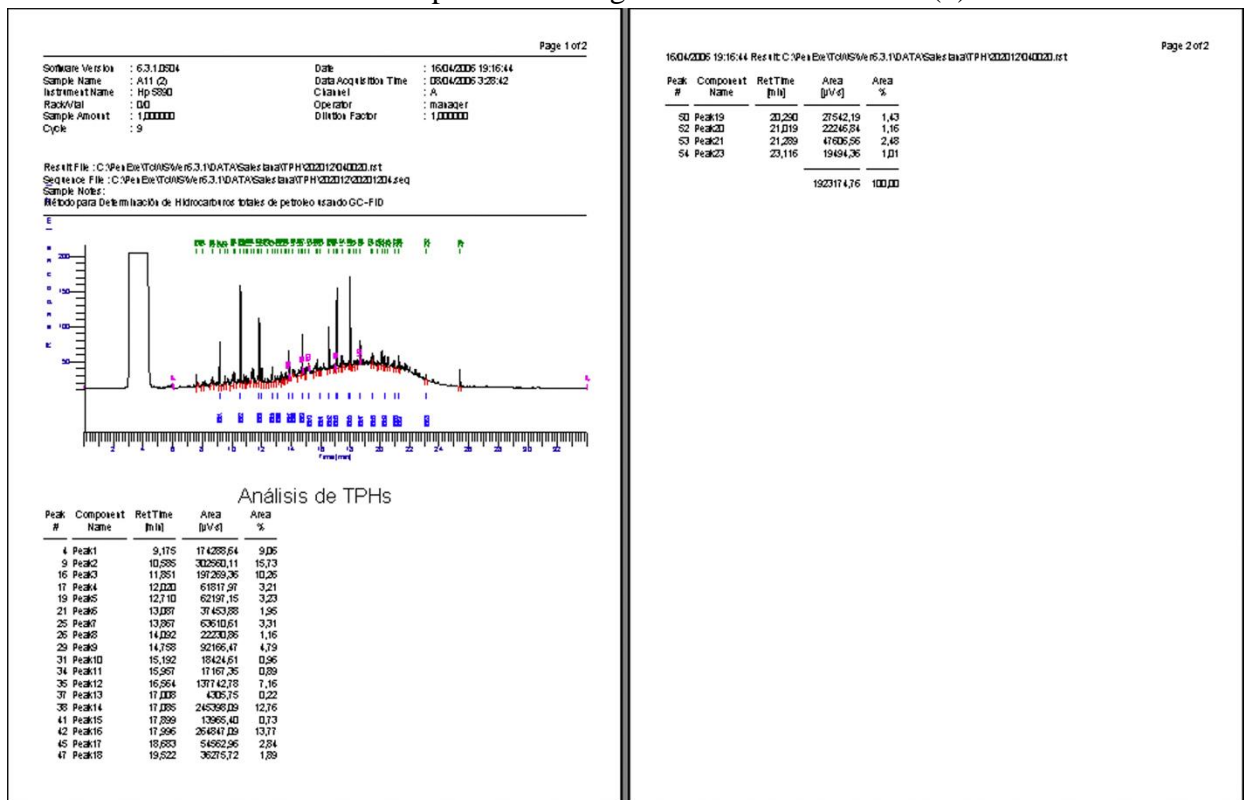
8.2.2. Anexo B2 Reportes Cromatográficos de los Tratamientos



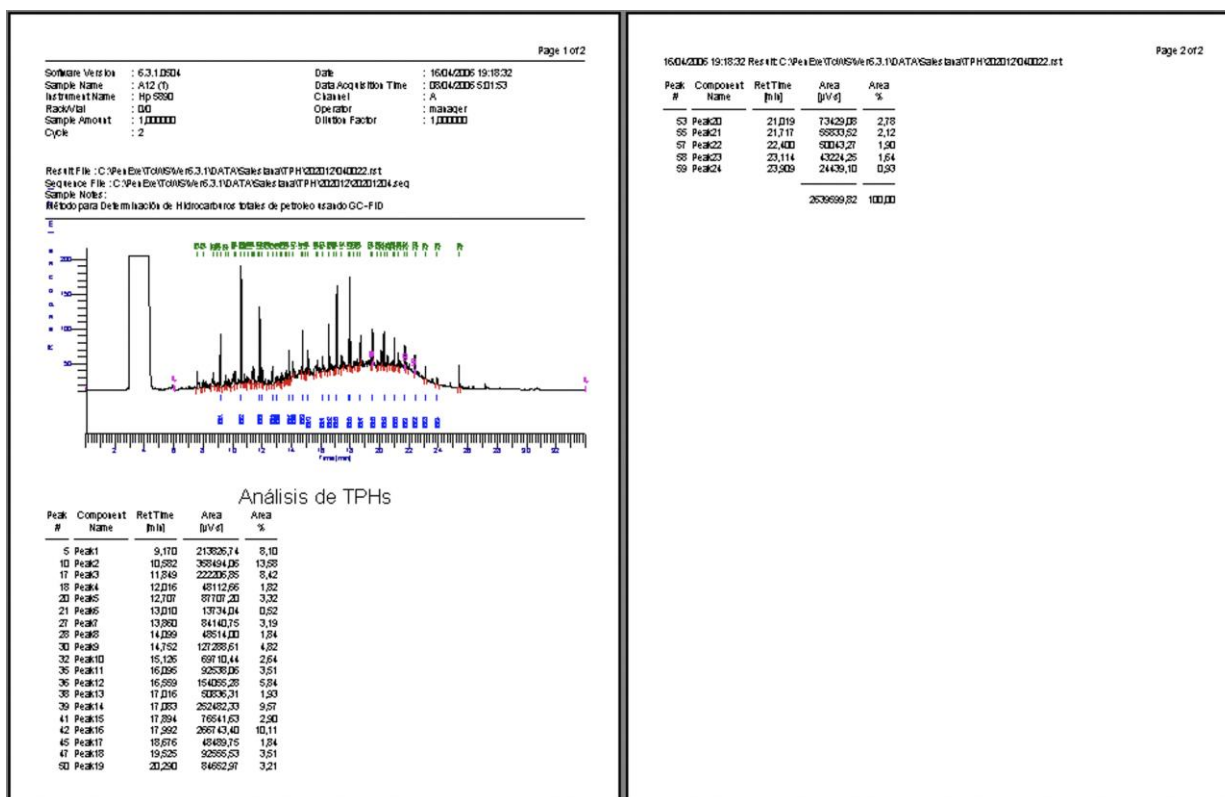
Reporte cromatográfico de la muestra Ci 10000 (1).



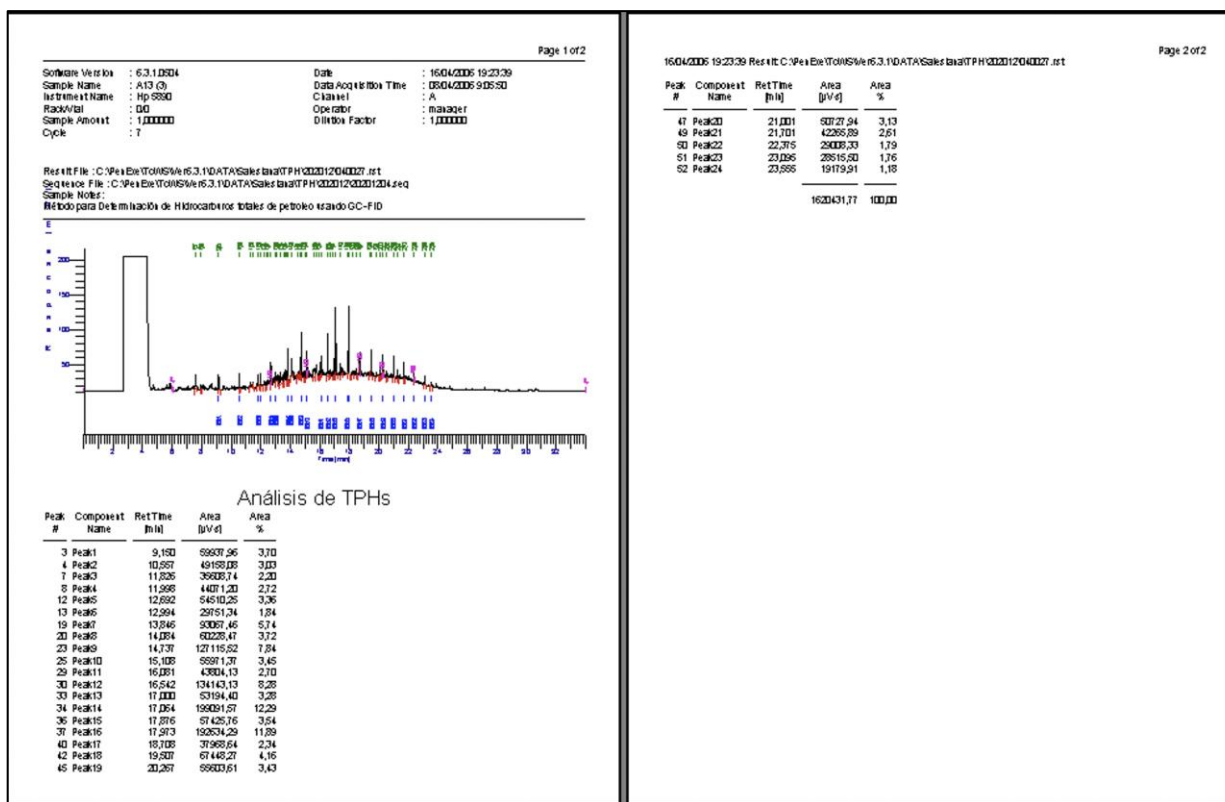
Reporte cromatográfico de la muestra T1 (1).



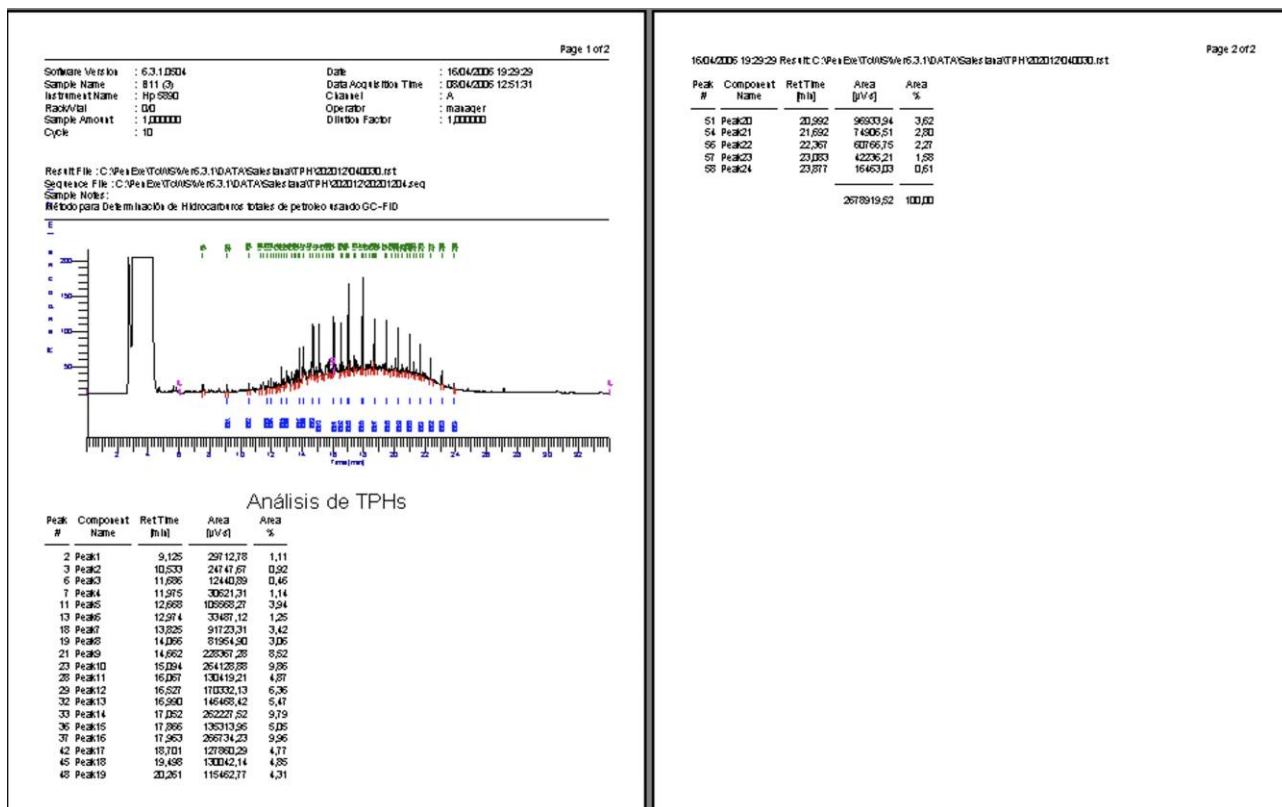
Reporte cromatográfico de la muestra A11 (2).



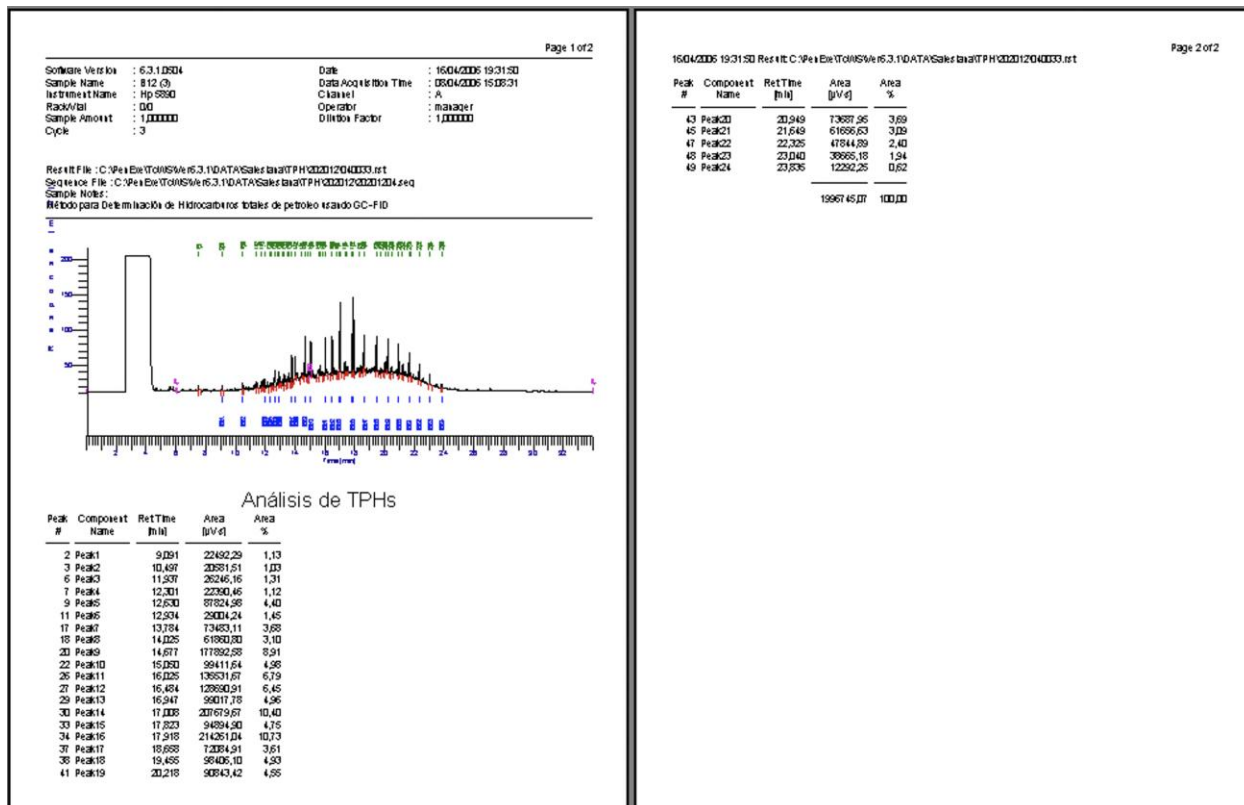
Reporte cromatográfico de la muestra A12 (1).



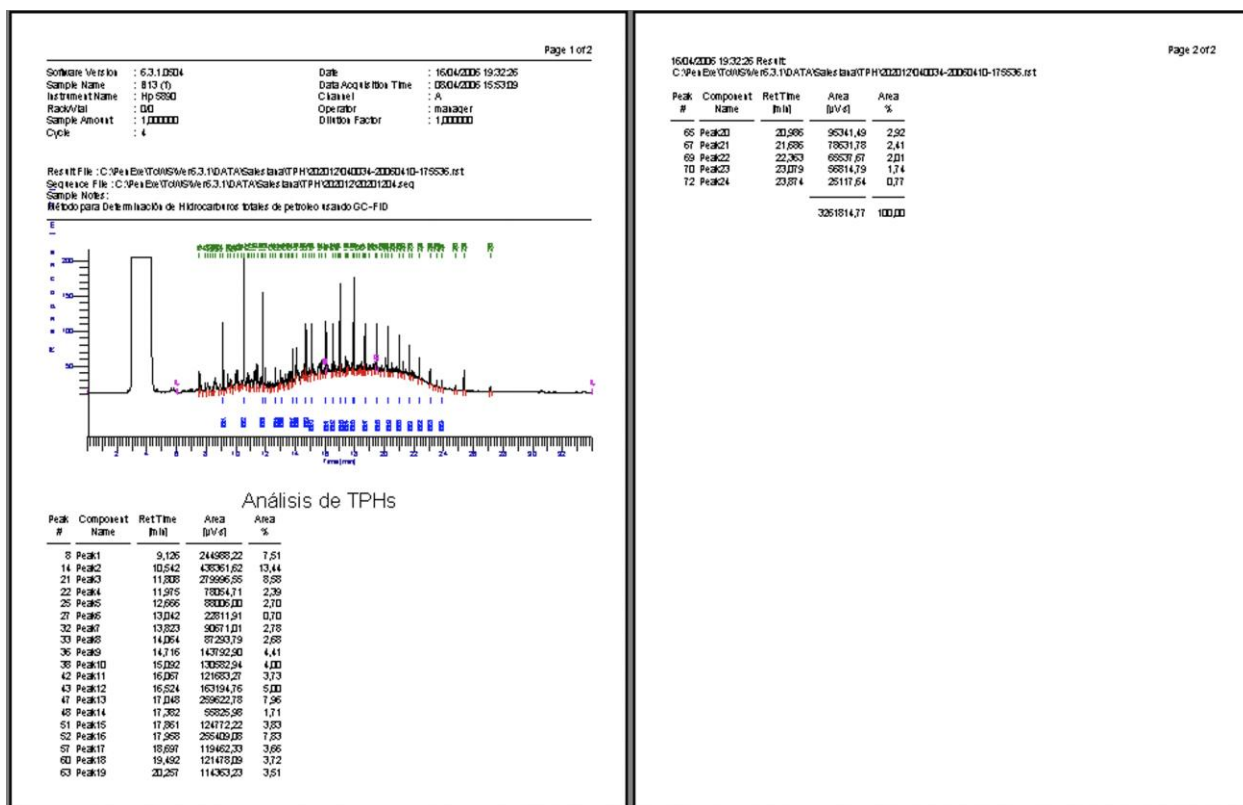
Reporte cromatográfico de la muestra A13 (3).



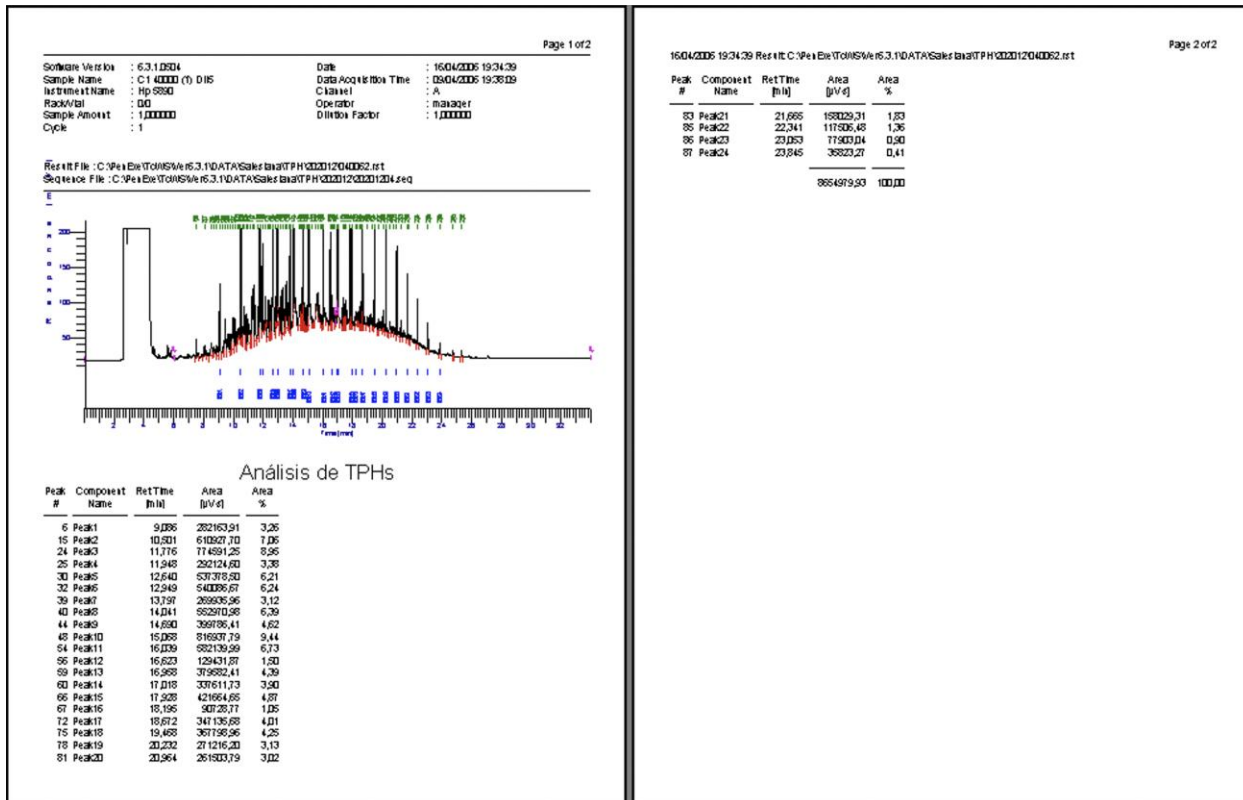
Reporte cromatográfico de la muestra B11 (3).



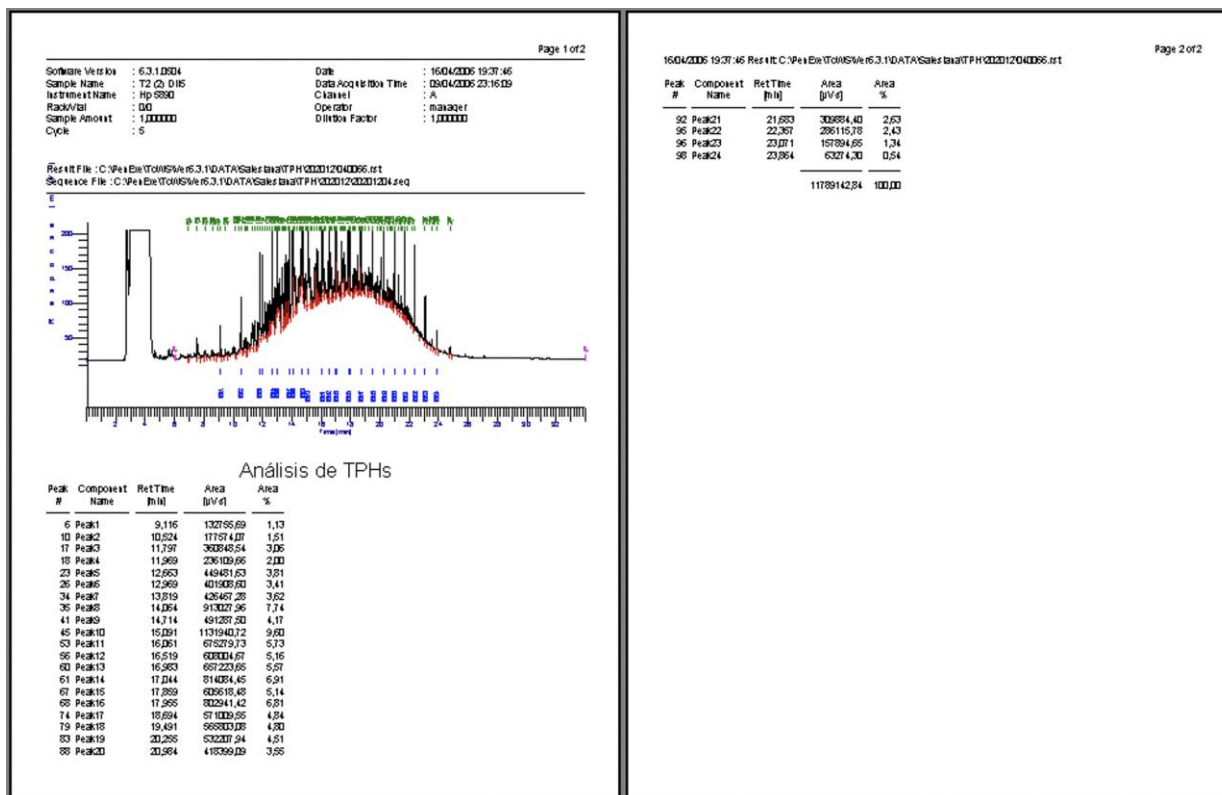
Reporte cromatográfico de la muestra B12 (3).



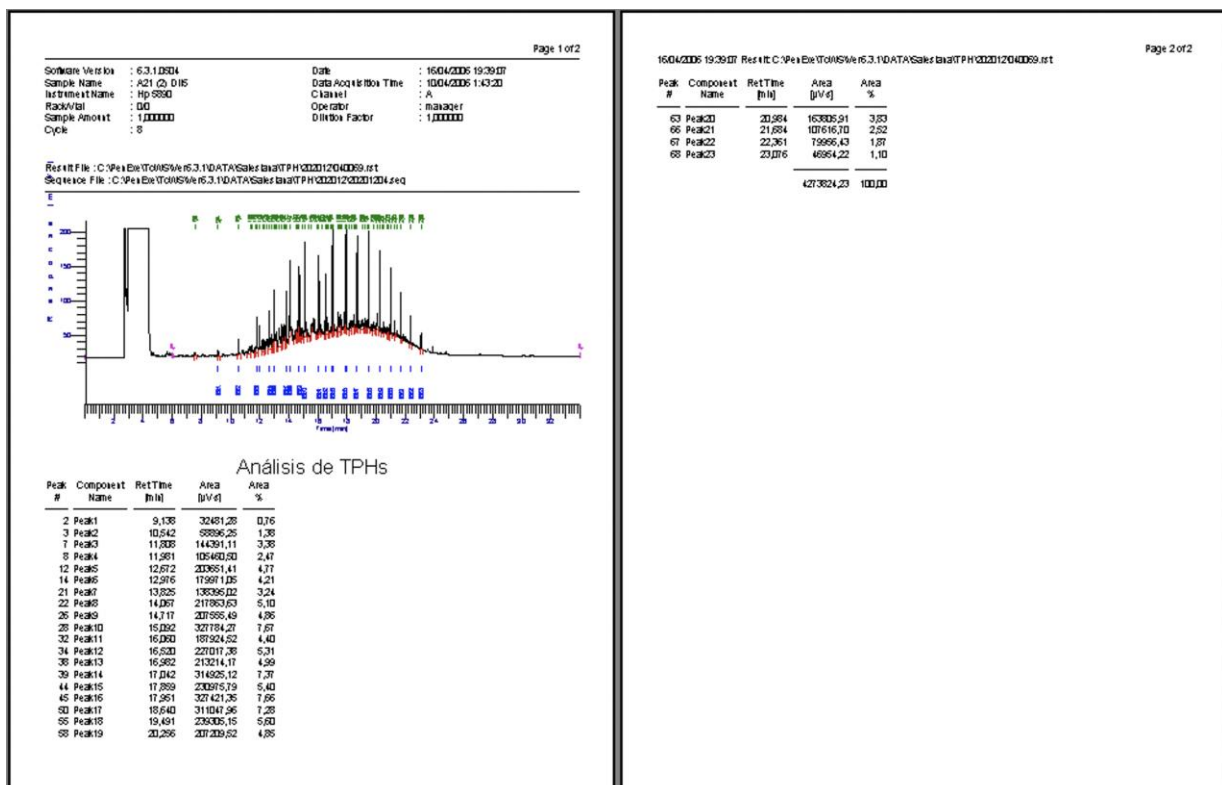
Reporte cromatográfico de la muestra B13 (1).



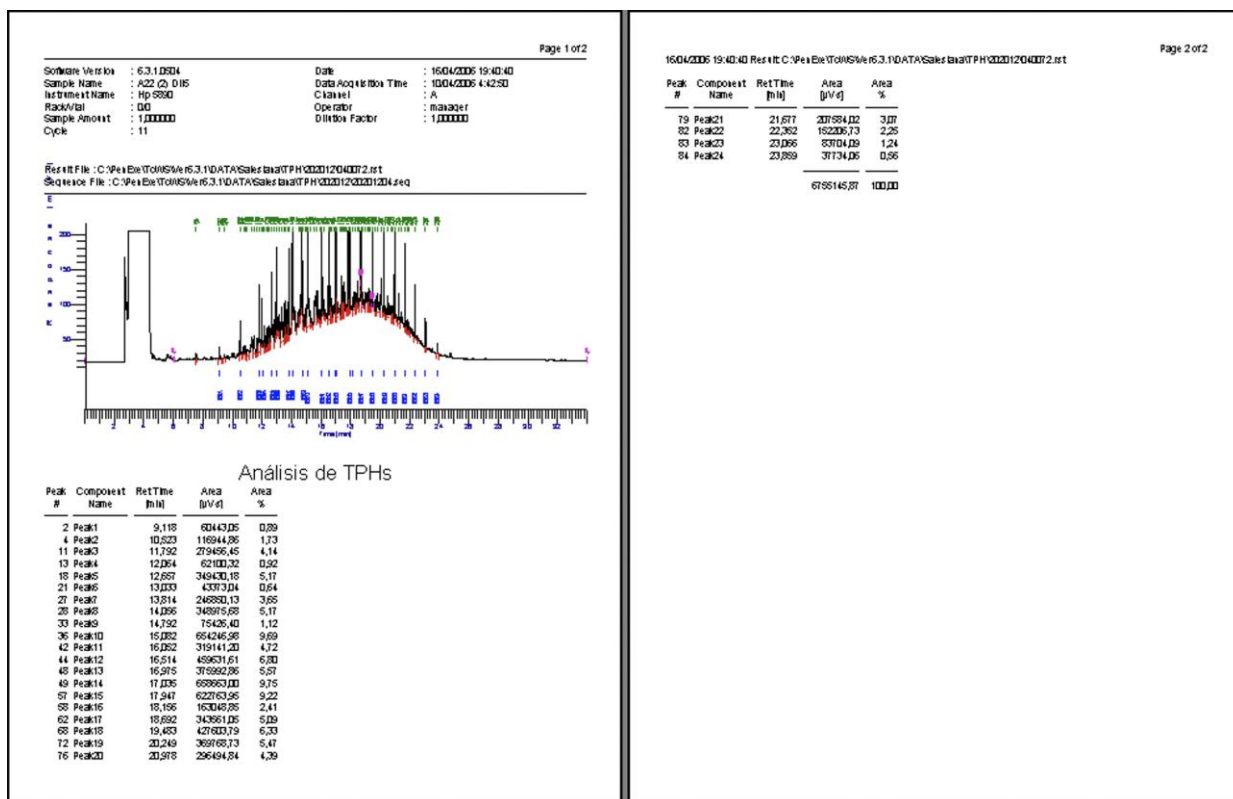
Reporte cromatográfico de la muestra C1 40000 (1).



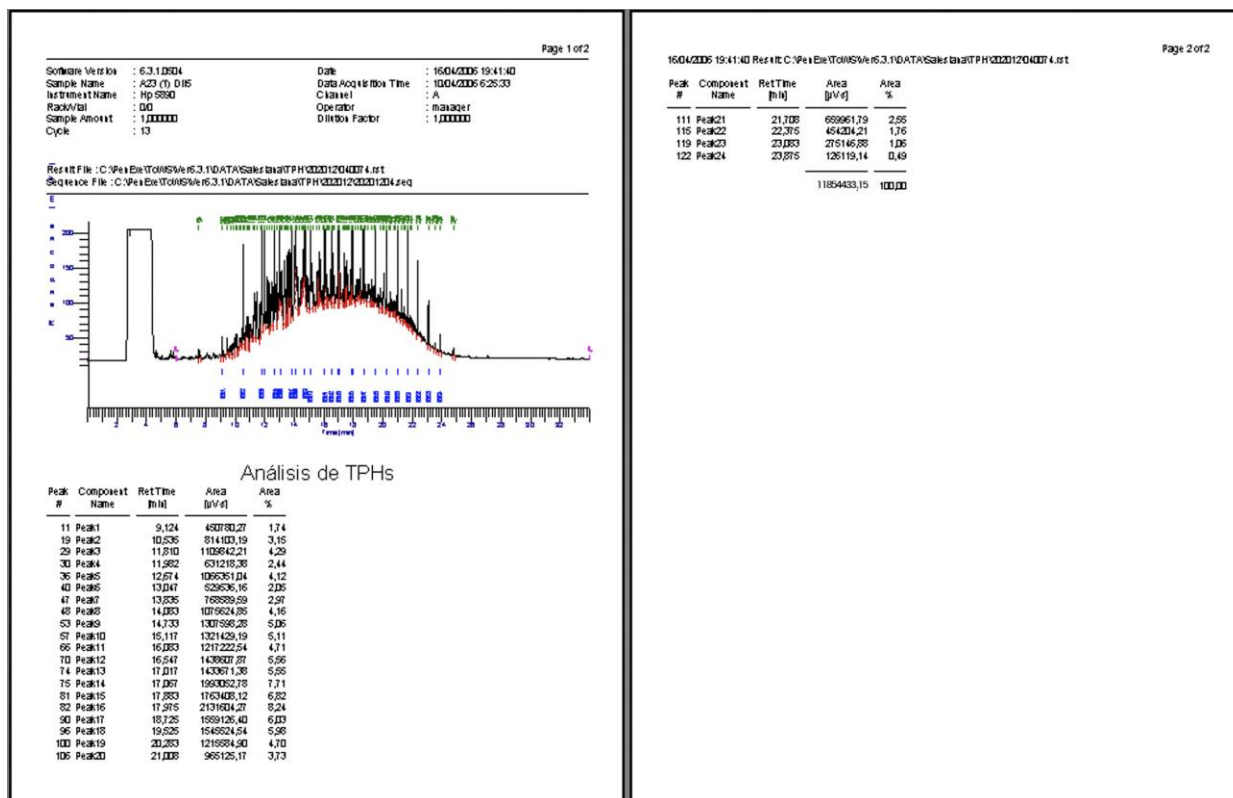
Reporte cromatográfico de la muestra T2 (2).



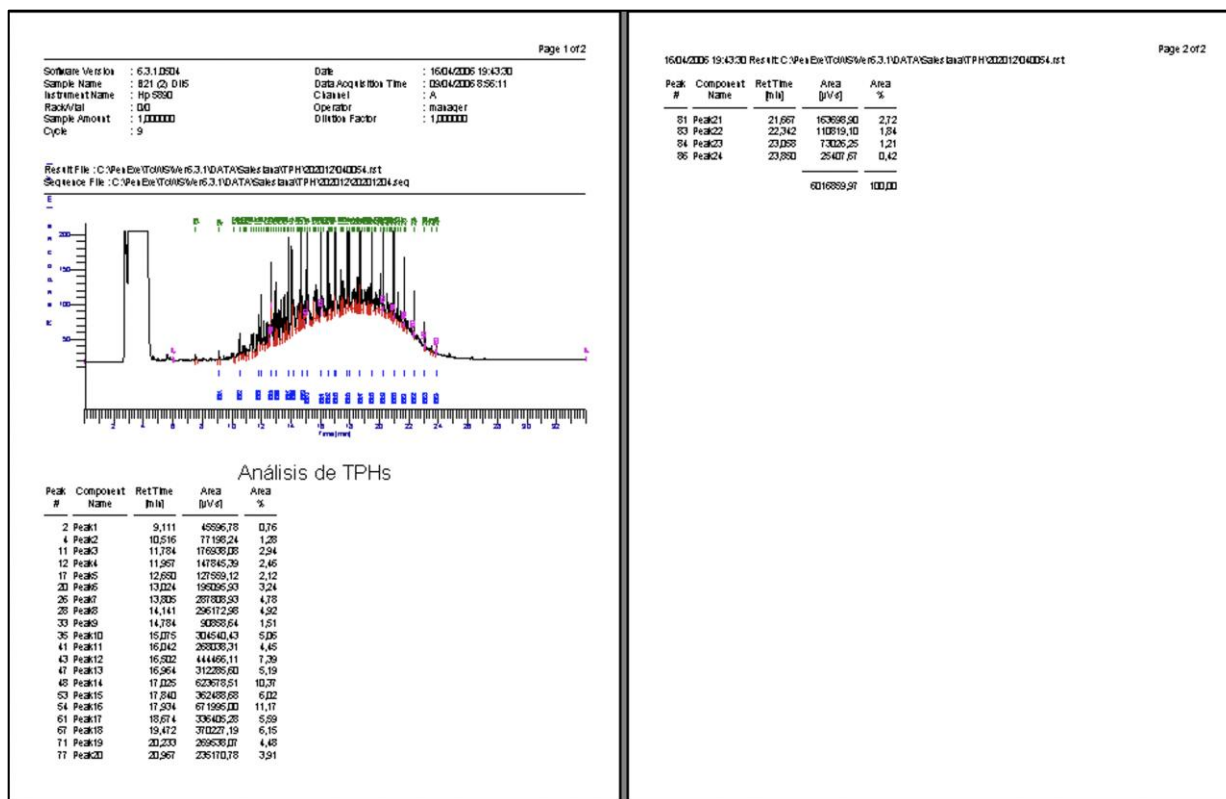
Reporte cromatográfico de la muestra A21 (2).



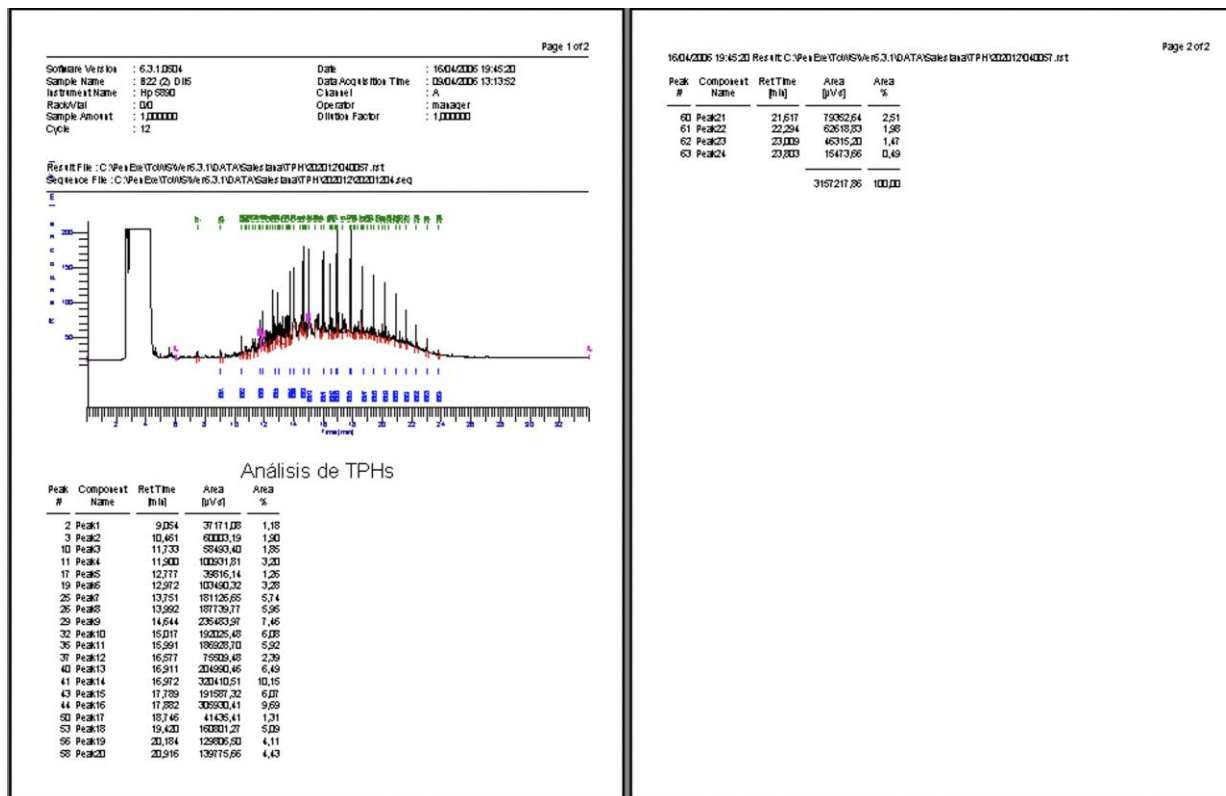
Reporte cromatográfico de la muestra A22 (2).



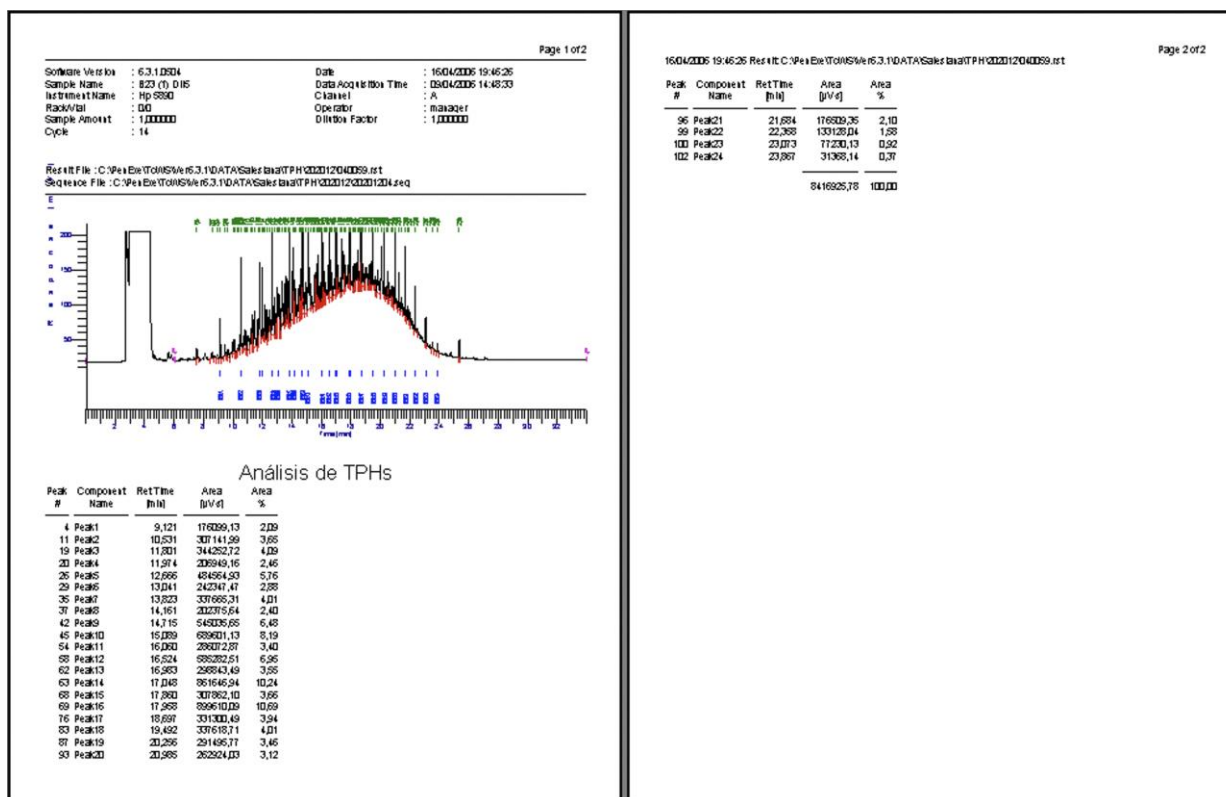
Reporte cromatográfico de la muestra A23 (1).



Reporte cromatográfico de la muestra B21 (2).



Reporte cromatográfico de la muestra B22 (2).



Reporte cromatográfico de la muestra B23 (1).